

UNIVERSITÉ DE CLERMONT

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970

3
N €

THESES
pour le
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)
par

J e a n G U I L L O T

Pharmacien

Maître ès Sciences

né le 1er Septembre 1938 à Clermont-Ferrand (Puy de Dôme)

Présentées et soutenues le 15 Juin 1970.

1ère THESE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE DE
QUELQUES HEMAGGLUTININES DES MYCETES.

2ème THESE : PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE.

Président : M. COULET, Professeur

Membres de Jury : M. CHAMPAGNAT, Professeur
Mme GAILLARD, Professeur
Mme POURRAT, Professeur.

CLERMONT - REPRODUCTION

64, avenue Jean Noellet

63 - AUBIERE (1970)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE CLERMONT

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970

N

T H E S E S
pour le
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)
par

J e a n G U I L L O T

Pharmacien

Maître ès Sciences

né le 1er Septembre 1938 à Clermont-Ferrand (Puy de Dôme)

Présentées et soutenues le 15 Juin 1970.

1ère THESE : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ACTIVITE DE
QUELQUES HEMAGGLUTININES DES MYCETES.

2ème THESE : PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE.

Président : M. COULET, Professeur

Membres de Jury : M. CHAMPAGNAT, Professeur
Mme GAILLARD, Professeur
Mme POURRAT, Professeur.

CLERMONT - REPRODUCTION

64, avenue Jean Noellet

63 - AUBIERE (1970)



Doyen : G. MEYNIEL

Assesseur : M. COULET

Doyen Honoraire : M. CUVELIER Directeur Honoraire : M. MERLE

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET - MM. BUREAU,

M. POMMÉ - M. WILLEMIN-CLOG

M. GERMAIN - M. VAURS

I - Professeurs Titulaires.

MM. BARRIER	Clinique Chirurgicale
BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	Clinique Obstétricale
BERGER	Chimie Analytique
BERGERON	Pathologie Médicale
CLUZEL	Bactériologie
COULET	Botanique et Microbiologie
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	Biochimie Médicale
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	Anatomie Pathologique
DUCHENE-MARULLAZ	Pharmacologie
FEBVRE	Pharmacie Galénique
FOURRIER	Orthopédie
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM. GRAS	Clinique Médicale A
JACQUEMET	Technique Chirurgicale
JALLUT	Séméiologie Médicale
JANNY	Neuro-Chirurgie
LATAIX	Clinique Chirurgicale
MERCIER	Anatomie
MEYNIEL	Biophysique Médicale
MOLINA	Clinique Pneumo-phtisiologique
PETIT	Médecine Légale et Médecine Sociale
POROT	Clinique Neurologique et Psychiatrique
POURRAT	Matière Médicale
Mle RAMPON	Thérapeutique
MM. ROUHER	Clinique Ophtalmologique
TERRASSE	Clinique Médicale B
THIEBLOT	Physiologie
THOMAS	Clinique Oto-Rhino-Laryngologie
TRONCHE	Pharmacie Chimique
TURCHINI	Histologie et Embryologie

II - Professeurs Titulaires à Titre Personnel.

MM. ALFIERI	Biophysique Médicale
CHAMPEIX	Médecine Légale et Médecine du Travail
VIALLET	Electro-Radiologie

III - Professeurs sans Chaire.

M ^{le} CHATONIER	Chimie Minérale et Minéralogie
MM. MENUT	Pédiatrie et Puériculture
PIGNIDE	Médecine Générale
Mme POURRAT	Matière Médicale

IV - Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. ANDRAUD	Toxicologie
BAGUET	Thérapeutique, Réanimation Médicale
BOUCHER	Physiologie
BOURDEIX	Chirurgie Générale
CONSTANTIN	Anesthésiologie
COUQUELET	Pharmacie Chimique
GAILLARD DE COLLOGNY	Oto-Rhino-Laryngologie
GENTOU	Biochimie Médicale
MALET	Histologie, Embryologie, Cytogénétique
MARCHEIX	Médecine Interne
Mme MOINADE	Médecine Générale et Thérapeutique
MM. NEVEU	Urologie
PERI	Stomatologie
Mme PETIT	Chimie Analytique
MM. PLAGNE	Cancérologie Clinique
RAYNAUD	Pédiatrie
SOLÉ	Ophthalmologie
VENRIÈS de LAGUILLAUMIE	Anatomie Pathologique

V - Agrégés.

RENARD	Pneumo-Phtisiologie
TOURNILHAC	Neurologie et Psychiatrie

VI - Délégués dans les Fonctions de Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. AIACHE	Pharmacie Galénique
BOYER	Chimie Biologique
GUILLOT	Botanique
VANNEUVILLE	Anatomie

Attaché Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentées à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération du 6 Juin 1956).

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

*Monsieur le Professeur M. COULET
Assesseur de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie
Professeur de Botanique et Microbiologie
Biologiste des Hôpitaux*

AUX MEMBRES DU JURY

*Monsieur le Professeur CHAMPAGNAT
Professeur de Physiologie végétale
à la Faculté des Sciences*

*Madame le Professeur GAILLARD
Professeur de Physique Pharmaceutique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie*

*Madame le Professeur POURRAT
Professeur sans chaire
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie*

*Il est remarquable que la première observation d'une hémagglutination, c'est-à-dire d'une agglutination de globules rouges humains ait été faite par des auteurs qui utilisaient des extraits végétaux : c'est en effet avant la découverte du premier système de groupes sanguins par Landsteiner (1) que les effets agglutinants de la « ricine » du *Ricinus communis* ont été décrits par Stillmark en 1888 (2), ceux de l'« abrine » d'*Abrus precatorius* par Hellin en 1891 (3), ceux de la « crotine » de *Croton tiglium* par Elfstrand en 1897 (4), ceux de la « robine » de *Robinia pseudoacacia* enfin par Lau en 1901 (5).*

Après les travaux de Landsteiner qui mit en évidence, en 1901 (6) les groupes sanguins du système ABO chez l'homme, l'intérêt s'est porté sur les agglutinines humaines dont la spécificité était à la base même des divers systèmes de groupes. Les hémagglutinines végétales dont la présence fut constatée dans de nombreuses plantes paraissaient non spécifiques et multivalentes à l'égard des hématies de l'homme. Cependant si jusqu'en 1948 aucune ne s'est montrée comparable aux isoagglutinines sériques, certaines, parmi elles, présentaient une spécificité plus ou moins marquée pour les hématies animales.

*En 1948, pour la première fois, Renkonen (7) découvre une agglutinine spécifique des hématies humaines de groupe A, dans les semences de *Vicia Cracca*: ce travail a donné un intérêt nouveau aux hémagglutinines végétales et un ensemble de recherches a permis de connaître d'autres agglutinines spécifiques ou « lectines », selon le terme proposé par Boyd (8), de préciser leurs propriétés générales et leur constitution, d'étudier leur purification, d'envisager leurs applications pratiques dans la détermination des groupes sanguins et dans la séparation des hématies, d'examiner leurs rapports avec des oses ou des polysaccharides de structure connue.*

C'est précisément en utilisant une hémagglutinine végétale, celle de *Phaseolus vulgaris*, pour séparer dans le sang les leucocytes des hématies, que Nowell, en 1959 (9) a constaté son effet sur les lymphocytes en culture, qui sont alors l'objet d'une transformation lymphoblastique et d'une induction mitotique imprévues. L'intérêt porté aux hémagglutinines végétales devait en acquérir un nouvel essor, au cours duquel furent examinés les effets de cette « P.H.A. » du *Phaseolus vulgaris* et d'autres substances comparables, sur la membrane, sur l'incorporation de l'uridine et de la thymidine, sur l'ultrastructure cellulaire, en même temps que se développaient leurs applications diagnostiques, pour l'obtention des caryotypes et l'étude de la réactivité lymphocytaire, et thérapeutiques dans la lutte contre certaines aplasies médullaires.

Enfin, très récemment, cette intervention des hémagglutinines végétales dans le comportement des lymphocytes, cellules hautement responsables au cours du développement de l'immunité, devait conduire des chercheurs à s'interroger sur l'interférence possible de ces hémagglutinines avec les réponses immunitaires d'un organisme.

Ainsi s'explique la mise en oeuvre de nombreuses recherches sur les phythémagglutinines, dans les domaines qui se sont successivement ouverts à leur application. Dans cet ensemble, les Spermaphytes ont fourni la plus grande part de matières premières, et les Thallophytes, explorés initialement par Ford en 1911 (10) n'ont fait l'objet que d'investigations limitées.

Pourtant, les Algues, les Lichens et les Mycètes groupent, ainsi que l'ont montré des explorations systématiques (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) de nombreuses espèces riches en substances agglutinantes ; l'identification parfois hasardeuse des récoltes et la difficulté de conserver les thalles ou les carpophores expliquent sans doute la relative pauvreté des travaux concernant ces végétaux : nous nous proposons ici l'étude particulière de certaines « mycoagglutinines » dont nous avons envisagé l'action sur les hématies et les relations avec les oses, par comparaison avec une isohémagglutinine humaine anti-A et l'agglutinine non spécifique de *Phaseolus vulgaris* L.

Cette étude est consacrée au comportement de quelques hémagglutinines rencontrées chez les Basidiomycètes : abordée dans l'intention de connaître les éventuelles perturbations apportées par ces agglutinines aux hématies sur lesquelles elles se fixent, elle nous a conduit à examiner quelles substances osidiques pouvaient inhiber cette action agglutinante et d'émettre ainsi quelques hypothèses sur certains de leurs sites de fixation. Il était nécessaire, pour l'effectuer, de disposer de préparations agglutinantes définies, et de pouvoir déterminer leur titre. Ce travail comprend donc quatre parties successives :

- Purification des agglutinines*
- Dosage des agglutinines*
- Survie des hématies de lapin après traitement par les hémagglutinines*
- Influence des oses sur les hémagglutinines*

au terme desquelles se placent les conclusions générales.

PREPARATION
DES
AGGLUTININES

Dès qu'on envisage d'étudier l'action des agglutinines sur les cellules sensibles dans des conditions reproductibles, se pose le problème de leur purification, sinon de leur isolement.

Les agglutinines sont présentes à l'état naturel dans des mélanges complexes, susceptibles de contenir des modificateurs, voire des inhibiteurs de la réaction d'agglutination. D'autre part, certains constituants de ces mélanges peuvent avoir une action propre sur les cellules mises en jeu.

L'emploi de sérums et extraits bruts ou insuffisamment purifiés ne permet pas alors de déterminer ce qui appartient en propre à une agglutinine. Un exemple typique de cette difficulté nous est apporté par certains extraits végétaux possédant un pouvoir mitogène vis-à-vis des lymphocytes humains en culture ; tant que l'on a utilisé des préparations mal définies, certains auteurs ont pu soutenir que les activités hémagglutinantes et blastogénique étaient totalement indépendantes alors qu'on a pu reconnaître qu'il en allait différemment quand on a pu séparer des fractions définies (20, 21).

I - REVUE DES DIFFERENTES METHODES DE PURIFICATION DES HEMAGGLUTININES.

Les méthodes de purification des hémagglutinines sont nombreuses. Toutefois, on peut aisément les répartir en deux catégories qui font toutes appel à des extraits d'organes ou tissus broyés.

- La première contient des méthodes que l'on peut qualifier d'aspécifiques, les procédés appliqués aux agglutinines étant ceux employés en général, pour la purification des protéines.

Le principe consiste à isoler, parmi les multiples composants du mélange, une fraction aussi étroite que possible, dans laquelle la concentration de la substance désirée apparaît la plus élevée.

- A la dernière catégorie appartiennent des méthodes qui mettent en jeu l'agglutination elle-même.

1°) PROCEDES NON SPECIFIQUES.

- Précipitation fractionnée par des solutions salines.

Le sulfate d'ammonium est le sel le plus souvent utilisé. Aux basses concentrations, il précipite d'abord une fraction importante de protéines indésirables, puis les hémagglutinines, pour des teneurs allant de 40 à 70 %. Parmi les agglutinines végétales préparées par ce procédé, on peut citer celles de :

- *Ricinus communis* (22, 23, 24)
- *Phaseolus vulgaris* (25)
- *Phaseolus lunatus* (26)
- *Dolichos lablab* (27)

- *Datura metel* (28)
- *Pisum sativum* (29)

Le sulfate de sodium a, de même, permis la purification de la lectine de *Ricinus communis* (22).

- Précipitation fractionnée par des solvants.

L'acétone, ainsi que l'alcool éthylique, à différents titres, permettent d'isoler des fractions plus riches en hémagglutinines, à partir d'extraits végétaux. Ces deux solvants peuvent être employés concurremment (30) ou encore associés au sulfate d'ammonium (31 , 32).

Ce type de méthode a été appliqué aux hémagglutinines de *Solanum tuberosum* (33), *Phaseolus vulgaris* (29), *Glycine hispida* (34), *Bauhinia purpurea* (35), *Dolichos biflorus* (36), *Ulex europaeus* (36).

A l'heure actuelle, les précipitations par sels ou solvants sont à ranger parmi les techniques tendant à éliminer la plus grande partie du matériel inactif dans les extraits destinés à la chromatographie ou à l'électrophorèse (37, 38).

- Séparation par chromatographie sur colonne.

Divers substrats sont couramment employés, tant pour la préparation des phytohémagglutinines, que pour l'isolement de fractions sériques contenant des isohémagglutinines.

a) Chromatographie sur phosphate de calcium :

Elle a été appliquée à *Soja hispida* par Lis (34, 39), et à *Phaseolus vulgaris* par Borjeson (40).

b) Chromatographie sur poudres de celluloses échangeuses d'ions.

- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--------|
| - DEAE-cellulose pour | <i>Glycine hispida</i> | (34) |
| | <i>Robinia pseudoacacia</i> | (37) |
| | <i>Agaricus campestris</i> | (41) |
| | <i>Phaseolus vulgaris</i> | (42) |
| - CM-cellulose pour | <i>Glycine hispida</i> | (34) |
| | <i>Robinia pseudocacia</i> | (37) |
| - Sulfoéthyl-cellulose pour | <i>Solanum tuberosum</i> | (43) |

c) *Chromatographie sur Bio-gel*

- Pour *Otala lactea* (44)

d) *Chromatographie d'exclusion-diffusion ou filtration sur gel.*

Les gels de polydextran (Sephadex) à divers degrés de réticulation, permettent la récupération pratiquement quantitative des composants chromatographiés. Différentes lectines ont été préparées par ce procédé (45, 46, 47, 48). On verra au paragraphe suivant que le Sephadex peut, de par sa constitution physico-chimique même, constituer un outil de purification spécifique de certaines hémagglutinines végétales.

Ces divers types de chromatographie sont quelquefois associés: les éluats sont alors repris à la sortie de la colonne pour de nouveaux passages sur d'autres supports.

Plusieurs auteurs, dont Ishizaka (49) ont pu montrer la répartition des isoagglutinines parmi les IgA, IgG et IgM grâce à des passages successifs d'éluats sériques sur des supports différents.

- **Séparation par électrophorèse.**

a) *Electrophorèse en continu :*

- Sur poudre de cellulose (50)
- Sur gel d'agar (51)
- Sur gel de polyacrylamide (52)

b) *Electrophorèse sur gel d'amidon :*

D'Antonio et Scheinberg ont séparé par électrophorèse de zone une agglutinine anti-A immune et la lectine anti-A de *Phaseolus lunatus* (53).

2°) PROCÉDES SPECIFIQUES.

- **Emploi des oses.**

Le premier des procédés met à profit les phénomènes d'inhibition des hémagglutinines par les oses.

Makelä (54) a montré que les phytohémagglutinines pouvaient se répartir en 4 groupes selon l'aptitude qu'ont les différents hexoses à les inhiber. Par un mécanisme sans doute comparable à la réaction antigène-anticorps.

au niveau des récepteurs érythrocytaires, des hexoses rangés dans une même catégorie, de par leur configuration stéréo-isomérique, réagissent comme des haptènes pour bloquer les déterminants de tel ou tel groupe d'agglutinines.

Ainsi, les phytohémagglutinines appartenant au groupe III seront inhibées par le glucose et les sucres présentant une position analogue des groupements OH au niveau des carbones 3 et 4.

Si l'on dispose dans une colonne une macromolécule comme le polydextran, dans laquelle la configuration spatiale au niveau de ces carbones 3 et 4 reste intacte et disponible, et qu'on y fait passer un extrait contenant une agglutinine inhibée par le glucose, cette agglutinine est retenue. Après lavage de la colonne jusqu'à disparition des protéines dans l'effluent, l'agglutinine est éluée au moyen d'une solution glucosée. La dialyse de l'éluat contre une solution saline isotonique permet ensuite d'éliminer le glucose et de récupérer la fraction agglutinante.

Dans ce cas, le polydextran ne réalise donc pas une filtration moléculaire, mais contribue à retenir la molécule active par sa constitution polysidique.

La concanavaleine (55), les hémagglutinines de *Pisum sativum* (56) et *Lens culinaris* (57) ont été hautement purifiées par cette méthode.

- Emploi d'hématies.

La purification et la concentration des anticorps agglutinants (58), des hémagglutinines virales (59, 60) ou végétales (61) contenues dans les antisérums ou extraits, peuvent être obtenues en sensibilisant des hématies puis en soumettant les cellules lavées à un processus d'éluat. La réaction entre l'hémagglutinine et le récepteur érythrocytaire étant le plus souvent exothermique (58, 62), il est préférable de réaliser la mise en contact ainsi que les différents lavages à une température aussi basse que possible soit entre 0 et 4° C. Toutefois, l'étude de l'optimum thermique d'action des agglutinines explique certains échecs de cette méthode et peut conduire à opérer à d'autres températures.

Pour éluer les agglutinines, il suffit ensuite de chauffer les hématies remises en suspension dans une quantité appropriée d'une solution isotonique, la température d'élution ne dépassant généralement pas 56° C, afin d'éviter une altération de la molécule protéique.

Toute l'hémagglutinine présente ne peut être recueillie en une seule fois, le phénomène de fixation-élution obéissant à un équilibre thermique, mais il est possible de pratiquer plusieurs éluions successives.

A côté de l'élévation de température, on peut faire appel à d'autres méthodes d'élution dans lesquelles on agit sur la composition du milieu : mise en suspension des hématies sensibilisées dans des solutions hypertoniques tamponnées ou non de NaCl, CsCl (63), MgCl₂, Na I, ou dans des solutions isotoniques à bas pH.

Dans certaines circonstances, l'élution peut être appliquée à des hématies sensibilisées *in vivo* : étude des anticorps incomplets au cours des anémies hémolytiques acquises (64, 65, 66, 67). De même, en médecine légale, la fixation d'anticorps sur des taches de sang, et leur élution après lavage, permettent la détermination indirecte des antigènes globulaires (68).

Dans la méthode originale, Landsteiner employait des hématies fraîches (69) ; les éluats obtenus dans de telles conditions sont fortement souillés de protéines globulaires, en particulier d'hémoglobine, et généralement peu actifs.

De nombreux auteurs ont tenté d'améliorer la qualité des éluats en travaillant non plus sur des hématies entières, mais sur des stromas (66, 70). Rigas et Johnson (52) ont employé au sein d'une colonne à chromatographie des suspensions de stromas pour purifier l'agglutinine de *Phaseolus vulgaris*.

Le principal reproche que l'on puisse adresser à ces techniques vient de la difficulté qu'il y a à préparer une quantité importante de stromas globulaires. Aussi, un grand progrès a-t-il été accompli grâce à l'utilisation d'hématies traitées par le formol. L'aldéhyde formique confère aux globules rouges une très grande résistance, en particulier à la chaleur et à l'hypotonicité, sans pour autant modifier la nature et le nombre de leurs sites antigéniques (71).

De plus, les suspensions d'hématies formolées laissent rapidement à la centrifugation un culot très net, dont on sépare aisément et totalement le surnageant.

Certains auteurs ont obtenu de bons résultats en remplaçant le formol par l'acide sulfosalicylique (72) ou l'aldéhyde glutarique (73). En dehors de leur emploi dans des techniques préparatives, les hématies formolées sont applicables au dosage des agglutinines (74). Goodman (75), en raison de leur grande stabilité, a pu les placer dans des colonnes à chromatographie, mélangées à des particules de polyuréthane pour fractionner des agglutinines anti-A.

Conduisant à la préparation d'hémagglutinines hautement et spécifiquement purifiées, la fixation-élution sur hématies formolées est donc une excellente méthode. Nous l'avons choisie pour l'obtention des hémagglutinines utilisées dans ce travail dans tous les cas où l'élution s'est avérée possible.

II - PURIFICATION DES HEMAGGLUTININES ETUDIEES.

Nous avons appliqué la méthode des hématies formolées à l'agglutinine humaine anti-A, à l'agglutinine de *Phaseolus vulgaris*, et aux agglutinines de divers champignons.

On verra qu'un certain nombre d'espèces ont été soumises à ce procédé sans résultats et que nous avons dû les traiter par des méthodes de précipitation qui seront exposées à la fin de ce chapitre.

PROCEDE PAR FIXATION-ELUTION.

1°) MATERIEL ET METHODES.

- Antisérum et extraits.

Le sérum humain anti-A est du sérum-test du Centre National de Transfusion Sanguine.

Les extraits végétaux sont préparés par broyage des semences ou des carpophores (frais ou placés dès leur récolte au congélateur à -20°C), dans 10 fois leur poids d'une solution de NaCl à 9 g. p. 1000. Les suspensions sont abandonnées à l'étuve pendant 2 heures, puis centrifugées. Les liquides surnageants sont séparés.

- Hématies formolées.

Les globules destinés à la préparation des éluats sont issus, soit de mélanges de sangs humains de groupe A1, soit de mélanges de sangs de poulets.

Notre méthode de préparation s'inspire de techniques proposées par plusieurs auteurs (76, 77, 78), en particulier par Cox et Pirtle (79). 100 ml de sang défibriné sont dilués par 100 ml de tampon à pH $7,2 \pm 0,05$ (NaCl 0,137 M, HNa_2PO_4 0,01 M, H_2KPO_4 0,003 M). Puis on ajoute par petites fractions en agitant continuellement 40 ml d'un mélange à parties égales de solution de formol du Codex, et de la solution tampon à double concentration. Après séjour de 1 h. 30 au bain-marie à 37°C en agitant, la suspension est centrifugée et le culot lavé à 2 reprises dans 50 volumes de solution tampon.

On reprend le culot globulaire dans assez de solution tampon pour obtenir 100 ml de suspension, auxquels on fait subir le même traitement. Après ce deuxième contact avec le formol, les hématies sont lavées 6 fois avec 50 volumes de tampon. Au moment de chaque lavage, on prend soin d'éliminer la pellicule grise qui surnage et correspond aux stromas d'hématies lysées.

Si les globules ainsi traités ne sont pas employés immédiatement, il faut les conserver au froid en présence d'un peu de formol (3 ml de la solution du Codex diluée au 1/10 par litre) pour éviter une pullulation microbienne. De telles suspensions sont utilisables plusieurs mois après leur préparation à condition de les soumettre à de nouveaux lavages au moment de l'emploi pour écarter toute trace de formol.

- Fixation et élution des agglutinines.

a) Fixation :

Dans un volume de préparation hémagglutinante on met en suspension un volume égal d'hématies formolées. Le mélange est abandonné une nuit dans un bain d'eau à 0° C. Cette température permet aux agglutinines de saturer au maximum les sites érythrocytaires. Les hématies sont ensuite séparées du surnageant dans une centrifugeuse réfrigérée à 0° C, et lavées plusieurs fois par une solution isotonique glacée de Na Cl.

b) Elution par la chaleur :

Une fois remises en suspension dans un même volume de solution isotonique, les hématies sont maintenues à 56° C, température permettant une élution des agglutinines sans entraîner une dénaturation partielle ; les isoagglutinines sont en particulier très sensibles à la chaleur et une diminution de l'activité apparaît dès 60° C.

Après 10 mn de séjour, on pratique une centrifugation à la même température, à 2000 t/mn pendant 3 mn. Les liquides surnageants constituant les agglutinines purifiées sont aussitôt séparés. Ces préparations sont pratiquement incolores.

Les hématies sensibilisées ayant subi une première élution peuvent être reprises par une nouvelle quantité de solution isotonique pour récupérer une fraction supplémentaire de l'agglutinine fixée.

c) Elution par des solutions hypertoniques :

Nous avons utilisé ces solutions pour tenter de séparer certaines agglutinines de mycètes. L'élution est pratiquée à 20° C, en mettant en contact le culot d'hématies sensibilisées avec un volume égal d'éluant.

Solutions hypertoniques :

NaCl	1,2 M	non tamponnée
NaCl	2 M	"
MgCl ₂	5 M, pH 7,5	en tampon tris 0,05 M
NaI	2 M, pH 9	"
NaI	5 M, pH 9	"

Après un temps de contact variant de 5 mn pour les solutions tamponnées à 45 mn pour les solutions de NaCl, les mélanges sont centrifugés et les surnageants dialysés pendant 24 h à 0° C contre 2.000 volumes de solution de NaCl à 8 p. 1000.

- Concentration des éluats.

Des agglutinines de haut titre peuvent être obtenues en concentrant les éluats par dialyse contre une solution de polyvinylpyrrolidone à 25 p. cent. L'isotonicité qui a pu varier quelque peu au cours de la concentration est réajustée par dialyse contre un grand volume de solution isotonique.

- Recherche et dosage du formol dans les éluats.

Destinés à des expériences sur les échanges gazeux, la durée de vie des hématies, ou à une introduction dans des cultures de lymphocytes (21), ces éluats ne doivent pas apporter de formol dans le milieu réactionnel. Nous avons utilisé en vue de sa recherche quantitative, la méthode de Velez et Deltour (80) appliquée par ces auteurs au dosage des corticoïdes urinaires formaldéhydogènes.

A 2,5 ml d'éluat, on ajoute dans un tube à essai bouché à l'émeri 0,2 ml d'une solution à 5 p. cent d'acide chromotrope, puis lentement et en refroidissant 2 ml d'acide sulfurique concentré ; on prépare simultanément un témoin contenant les réactifs et 2 ml d'eau bidistillée, et une gamme correspondant à des dilutions de la solution de formol du Codex, allant de 10^{-3} à 10^{-6} . Après agitation on porte au bain-marie bouillant 30 mn ; une coloration violette se développe. On refroidit et on lit au spectrophotomètre à 550mμ

- Titration rapide des agglutinines.

Les sérums, extraits et éluats sont titrés par la méthode des dilutions géométriques.

A chaque tube contenant 1 ml de dilution est ajoutée 1 goutte d'une suspension d'hématies à 4 p. cent.

La lecture est faite au miroir concave après abandon 2 h. à température de la pièce.

2°) RESULTATS.

- Dosage du formol dans les éluats.

La présence de formol n'a été décelée qu'au-delà d'une partie de la solution de formol du Codex pour 500.000.

- Isohémagglutinine anti-A.

a) données quantitatives concernant la fixation, le lavage, l'éluat :

On part d'un volume égal de sérum anti-A et d'hématies formolées humaines du groupe A1 sous forme de culot globulaire :

Nature du liquide titré	Titre.
- antisérum avant fixation	1028
- antisérum surnageant après fixation	4
- eaux du 1er lavage vol. à vol. à 0° C	1
2ème	±
3ème	0
- 1er éluat vol. à vol. à 56° C	256
- 2ème	128
- 3ème	64
- 4ème	32
- 5ème	16

b) Préparation de l'isoagglutinine pour une utilisation ultérieure :

L'élution de l'agglutinine apparaissant comme très faible à 0° C les lavages sont pratiqués avec des quantités importantes d'eau physiologique de l'ordre de 50 vol., ceci 5 fois de suite.

Le titre des éluats n'en est pas modifié pour autant.

c) Disparition du pouvoir agglutinant vis-à-vis des hématies de lapin :

Alors que des sérums bruts anti-A humains montrent une forte affinité envers les hématies de lapin, celles-ci ne sont pas agglutinées par l'agglutinine ainsi éluee des hématies humaines A1.

On peut en conclure qu'il existe normalement dans le sérum humain des hétéroagglutinines anti-animales responsables de l'agglutination observée au départ (62).

D'autre part, les hématies de lapin sont incapables d'abaisser le titre des éluats par incubation d'une partie de globules pour deux d'éluat pendant 1/2 heure : les isoagglutinines anti-A et anti-A1 n'ont pas d'affinité pour les récepteurs érythrocytaires d'animaux tels le lapin ou l'opossum (81), contrairement à l'isoagglutinine anti-B.

- Agglutinine de *Phaseolus vulgaris* L.

a) Etude quantitative avec des hématies formolées humaines de groupe A1:

Nature du liquide titré	Titre
- extrait brut	8.000
- extrait surnageant après fixation	1.028
- 1er lavage vol. à vol. à 0° C	512
- 2ème	256
- 3ème	128
- 4ème	64

Ces 4 lavages volume à volume sont suivis de 3 lavages à 0° C par 50 volumes de solution saline. On ne peut déceler d'agglutinine dans les eaux du 3ème lavage.

Nature du liquide titré	Titre
- 1er éluat vol. à vol. à 56° C	512
- 2ème	256
- 3ème	256
- 4ème	128
- 5ème	64

b) Préparation de la phytohémagglutinine:

5 lavages avec 50 volumes d'eau physiologique sont réalisés d'emblée pour assurer un retrait total du matériel inactif. Le titre des éluats n'est pas sensiblement modifié.

- Myco-hémagglutinines.

On trouvera, dans les tableaux I et II, les résultats concernant la fixation et l'élution à 56° C des myco-hémagglutinines étudiées.

A l'examen des tableaux, il apparaît que celles-ci puissent se répartir en 3 catégories :

- pour la majorité des espèces, la fixation se montre peu ou pas réversible, et ceci d'une façon plus accentuée avec les globules humains,

- inversement, les agglutinines de *Phallus impudicus* et *Polyporus sulfureus* s'éluent à basse température ;

- enfin, l'élévation de température provoque l'élution de l'agglutinine de *Clitocybe geotropa* sur hématies humaines et de *Lactarius controversus* sur hématies de poulet, dans des proportions comparables à celles observées pour la lectine du haricot.

Le chauffage des hématies sensibilisées restant sans effet dans la plupart des cas, nous avons alors tenté l'élution à l'aide de solutions hypertoniques.

L'étude a porté sur les espèces suivantes :

- *Boletus chrysenteron* Fr. ex Bul.
- *Boletus erythropus* Fr. ex Pers.
- *Boletus porphyrosporus* Fr.
- *Boletus purpureus* Fr.

- *Boletus subtomentosus* Fr.ex L.
- *Polyporus cristatus* Pers.
- *Lactarius rugatus* Kühn-Romagn.
- *Lactarius fuliginosus* Fr.
- *Lactarius deliciosus* Fr. ex L.
- *Clitocybe tabescens* (Fr. ex Scop.) Bres.
- *Psalliota campestris* Lange
- *Russula cyanoxantha* Fr. ex Schaef.
- *Calodon zonatum* (Batsch) Quél.
- *Pholiota squarrosa* (Fr. ex Müller)
- *Entoloma lividum* (Fr. ex Bull.)
- *Laccaria laccata* var. *amethystina* (Bull.)

Ces 16 extraits fongiques choisis parmi ceux dont l'agglutinine ne peut être éluee par voie thermique, ont été mis en contact avec des hématies formolées A1.

Comme précédemment, aucune agglutinine n'a pu être éluee par les diverses solutions hypertoniques utilisées.

Contrairement aux isohémagglutinines pour lesquelles la réversibilité quantitative de l'hémagglutination a été mise en évidence, et contrairement aux phytohémagglutinines des Angiospermes qui se prêtent à une préparation par élution thermique (au moins celles que nous avons étudiées jusqu'à maintenant), la majorité des mycoagglutinines se lient de façon irréversible à la surface des hématies. On peut s'interroger sur l'origine de ce phénomène, d'ailleurs souvent plus net avec les hématies A1 qu'avec les hématies de poulet : est-il dû à la mise en jeu au niveau de la membrane globulaire de sites totalement différents de ceux intéressés par les iso ou les phytohémagglutinines type *Phaseolus* ?

L'échec de la technique fixation-élution appliquée aux mycohémagglutinines a eu, pour nous, deux conséquences importantes :

D'une part, nous avons été conduits à retenir l'agglutinine de *Lactarius controversus* dans nos expériences concernant l'influence de telles substances sur la vie des hématies. *Clitocybe geotropa* qui avait permis l'obtention d'extraits très actifs au moment de cette expérimentation, ne nous a

TABLEAU I

Fixation-élution sur hématies humaines formolées de groupe A₁

	Pur	S	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	E
Bol. chrysenteron Fr. ex Bul.	1/32	0	0	0	0					0
Bol. erythropus Fr. ex Pers.	1/128	0	0	0	0					0
Bol. felleus Fr. ex Bul.	1/4	0	0	0	0					0
Bol. porphyrosposus Fr.	1/64	0	0	0	0					0
Bol. purpureus Fr.	1/128	0	0	0	0					0
Bol. subtomentosus Fr. ex L.	1/128	0	0	0	0					0
Cal. zonatum (Batsch) Quél.	1/128	+	0	0	0					0
Clit. geotropa Fr. ex Müller	1/512	0	0	0	0					1/128
Clit. nebularis Fr. ex Batsch	1/8	0	0	0	0					0
Clit. tabescens (Fr. ex Scop.) Bres.	1/128	0	0	0	0					0
Cort. anomalus Fr.	1/8	0	0	0	0					0
Ent. lividus (Fr. ex Bull.)	1/32	0	0	0	0					0
Flamm. lenta (Fr. ex Pers.)	1/8	0	0	0	0					1/1+
Lacc. laccata ame- thyst. (Bull.)	1/128	0	0	0	0					0
Lact. controversus (Fr. ex Pers.)	1/1024	+	0	0	0					1/2
Lact. controversus	1/128	0	0	0	0					1/1
Lact. deliciosus Fr. ex L.	1/128	0	0	0	0					0
Lact. evosmus Kühn.-Romagn.	1/128	0	0	0	0					1/32
Lact. fuliginosus Fr.	1/512	0	0	0	0					0
Lact. rugatus Kühn.-Romagn.	1/32	0	0	0	0					0
Lact. torminosus Fr. ex Schaeef.	1/16	0	0	0	0					1/1+
Lact. vellereus Fr.	1/64	+	0	0	0					0
Omph. chrysophylla Fr.	1/32	0	0	0	0					0
Phal. impudicus L. ex F.	1/128	1/4	++	++	++	++	+	+	+1/1	1/1
Phal. impudicus L. ex F.	1/2048	1/64		++	++	+	+	+	+	1/1
Phol. ochropallida Romagn.	1/4	0	0	0	0					1/1
Phol. squarrosa (Fr. ex Müller)	1/128	0	0	0	0					0
Polyp. cristatus Pers.	1/512	0	0	0	0					0
Polyp. sulfureus (Bull. ex F.) Karst.	1/512	1/2	+	+	+	+	+	1/1+		1/16
Psal. campestris Lange	1/64	0	0	0	0					0
Russ. cyanoxantha Fr. ex Schaeef.	1/16	0	0	0	0					0

TABLEAU II

Fixation-élution sur hématies de poulet formolées

	Pur	S	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	E
Bol. chrysenteron Fr. ex Bul.	1/32	0	0	0	0					0
Bol. erythropus Fr. ex Pers.	1/128	0	0	0	0					0
Bol. felleus Fr. ex Bul.	1/4	0	0	0	0					0
Bol. porphyrosporus Fr.	1/64	0	0	0	0					0
Bol. purpureus Fr.	1/128	0	0	0	0					0
Bol. subtomentosus Fr. ex L.	1/128	0	0	0	0					0
Cal. zonatum (Batsch) Quél.	1/128	0	0	0	0					+
Clit. geotropa Fr. ex Müller	1/512	1/1	+	+	1/2					1/8
Clit. nebularis Fr. ex Batsch	1/8	0	0	0	0					0
Clit. tabescens (Fr. ex Scop.) Bres.	1/128	1/16	1/8	+(h)	+(h)					1/2
Cort. anomalus Fr.	1/8	0	0	0	0					0
Ent. lividus (Fr. ex Bull.)	1/32	1/1+	0	0	1/1 [±]					1/1 [±]
Flamm. lenta (Fr. ex Pers.)	1/8	0	0	0	0					0
Lacc. laccata ame- thyst. (Bull.)	1/128	0	0	0	0					1/1
Lact. controversus (Fr. ex Pers.)	1/1024	1/2	±	±	±	±	±	1/1 [±]		1/64 1/128
Lact. controversus	1/128	1/2 [±]	0	0	0					1/8 1/16
Lact. deliciosus Fr. ex L.	1/128	0	0	0	0					1/2
Lact. evosmus Kühn. - Romagn.	1/128	1/4	±	+	1/2					1/8
Lact. fuliginosus Fr.	1/512	0	0	0	0					1/1
Lact. rugatus Kühn. - Romagn.	1/32	0	0	0	0					1/1 [±]
Lact. torminosus Fr. ex Schaeef	1/16	0	0	0	0					1/4 1/8
Omph. chrysophylla Fr.	1/32	0	0	0	0					0
Phal. impudicus L. ex F.	1/2048	1/256	+++	+++	++	++	++	++	1/8	1/64
Phal. impudicus L. ex F.	1/128	1/32	++	+	+	+	±	0	0	0
Phol. ochropallida Romagn.	1/4	1/1 [±]	±	±	±	±				1/1 [±]
Phol. squarrosa (Fr. ex Müller)	1/128	1/1	±	±	±					1/1 [±]
Polyp. cristatus Pers.	1/512	1/2	1/1	1/2	0					0
Polyp. sulfureus (Bull. ex F.) Karsten	1/512	0	0	0	0					1/8
Psal. campestris Lange	1/64	0	0	0	0					0
Russ. cyanoxantha Fr. ex Schaeef.	1/16	0	0	0	0					0

S = Titre du surnageant après fixation
L₁ = titre du 1er liquide de lavage
L₂ = titre du 2ème liquide de lavage

L₃ = titre du 3ème liquide
L₄ = titre du 4ème liquide
L₅, L₆, L₇ = idem
E = titre de l'éluat.

plus fourni, pendant plusieurs années, que des préparations d'un titre extrêmement bas, bien récolté dans des stations géographiquement éloignées.

Les tableaux I et II ont permis de voir que les hématies de poulet se prêtent mieux à la fixation-élution de l'hémagglutinine de *Lactarius controversus* que les hématies humaines. Les chiffres ci-dessous correspondent à un autre essai effectué à l'aide d'hématies de poulet :

Nature du liquide titré	Titre
- extrait brut	256
- surnageant	1
- 1er lavage vol. à vol. à 0° C	1
- 2ème	±
- 3ème	0
- 1er éluat vol. à vol. à 56° C	32
- 2ème	16
- 3ème	8
- 4ème	8
- 5ème	4

Ces résultats nous ont paru assez satisfaisants et nous ont amené à appliquer à cette hémagglutinine un mode de préparation absolument identique à celui décrit pour *Phaseolus vulgaris*, en substituant toujours les hématies de poulet aux hématies humaines.

D'autre part, dans le cadre d'une étude de l'action des oses sur les mycoagglutinines, ces dernières ont simplement été purifiées par précipitation.

PROCEDE PAR PRECIPITATION.

- Précipitation par le sulfate d'ammonium.

Les extraits sont additionnés de sulfate d'ammonium en quantité telle que la concentration finale soit de 70 g. p. cent. Après 24 heures de

contact, le précipité apparu est redissout au moyen d'une solution isotonique de chlorure de sodium et l'excès de sel précipitant est éliminé par dialyse.

Pour certaines mycoagglutinines, provenant de champignons riches en mucilage tels les bolets, le sulfate d'ammonium ne permet pas le retrait de substances visqueuses qui enrobent les agglutinats et empêchent leur passage dans les décanteurs de l'Auto-analyseur.

Nous avons dû faire appel alors à une méthode de précipitation à l'aide de solvants.

- Précipitation par l'alcool et l'acétone.

Les extraits sont additionnés d'un égal volume d'alcool éthylique à 25°C et le mélange est aussitôt centrifugé. L'agglutinine est ensuite séparée par précipitation du liquide surnageant au moyen d'acétone (2 volumes pour 1 de surnageant).

Le précipité est repris par de l'eau salée et la solution dialysée pendant 48 heures contre un excès de solution isotonique pour éliminer l'acétone et l'alcool.

DOSAGE
DES
AGGLUTININES

Lorsque l'on souhaite se livrer à une étude comparative de doses variées d'une même agglutinine, ou d'agglutinines d'origines différentes, il est nécessaire de connaître avec précision les concentrations relatives de préparation mises en jeu. D'autre part, comme toutes les protéines les agglutinines sont des molécules fragiles et il est souhaitable de pouvoir contrôler facilement si la conservation n'a point altéré leurs propriétés. Une bonne méthode de dosage sera précise, reproductible, et aisée à mettre en oeuvre.

I - LES DIFFERENTES METHODES DE L'HEMAGGLUTINATION QUANTITATIVE, CHOIX D'UNE TECHNIQUE DE TITRATION.

Nous passerons brièvement en revue ces méthodes, afin de choisir celle qui nous paraît la mieux adaptée à nos besoins.

1°) METHODE DES DILUTIONS GEOMETRIQUES.

C'est la plus commune en sérologie pour mesurer la concentration en anticorps d'un sérum. Ce dernier est dilué selon une progression géométrique de raison 2, puis chaque dilution reçoit une quantité fixe et connue de l'antigène correspondant. Après un temps de contact nécessaire au système pour atteindre l'équilibre, une réaction découlant de l'union antigène-anticorps : précipitation, floculation, agglutination, permet de déterminer la dilution considérée comme caractéristique.

Cette technique est applicable aux préparations hémagglutinantes : les différentes dilutions reçoivent une même quantité d'une suspension d'hématies et après incubation, on recherche la plus haute dilution pour laquelle une agglutination est encore visible. La lecture se fait, soit à l'oeil nu en observant l'aspect du sédiment ou de la suspension après agitation, soit microscopiquement.

Les résultats obtenus ont, dans bien des cas, une précision suffisante ; pourtant, la sensibilité et la reproductibilité d'un tel mode de titration sont médiocres. Il est souvent difficile d'apprécier la dilution finale, du fait de l'échelonnement du passage agglutination - non agglutination sur plusieurs tubes. La taille relativement faible des agrégats d'hématies obtenus avec certaines agglutinines ajoute encore à la difficulté de lecture.

Quelques auteurs (82) ont tenté d'améliorer la méthode en chiffrant de 0 à 10 le degré de l'agglutination, 0 pour les tubes sans agglutinat visible, 10 pour une agglutination maximum. La somme des séries de « notes » constitue alors le titre. En plus de sa subjectivité, on peut reprocher à ce procédé de mettre en jeu la taille des agglutinats , phénomène secondaire, ne dépendant pas directement du titre des agglutinines.

En opérant dans des conditions standardisées, un même manipulateur peut commettre une erreur d'une dilution au moins dans chaque direction, ce qui représente une variation quantitative énorme.

2°) DOSAGE PAR ABSORPTION.

On abaisse le titre d'un volume connu de préparation agglutinante par des contacts répétés avec des volumes égaux successifs d'hématies qu'on sépare ensuite en centrifugeant. Le titre relatif de la préparation est donné par le nombre d'absorptions nécessaires pour épuiser la préparation. Une variante consiste à mesurer le volume d'hématies requis pour retirer la totalité de l'activité hémagglutinante.

Ces méthodes sont particulièrement peu sensibles.

3°) DOSAGE DE L'AZOTE DE L'ANTICORPS.

C'est un procédé qui permet une expression pondérale par la mesure de l'azote de l'antigène, puis de l'azote du complexe antigène-anticorps. La différence représente l'azote de l'hémagglutinine absorbée.

Si cette technique est valable avec des antigènes très pauvres en matières azotées comme certains types de pneumocoques, il y a malheureusement une disproportion considérable entre la quantité d'azote contenue dans les hématies et celle appartenant à l'hémagglutinine fixée. La disproportion entre ces deux quantités masque la très faible variation survenant après la fixation.

Heidelberger et Treffers (83) ont modifié la méthode en travaillant avec des stromas, une grande partie de l'azote érythrocytaire étant alors éliminée ; la précision reste là encore toute relative.

4°) EMPLOI DES ISOTOPES.

Un marqueur radioactif, le plus souvent ^{131}I , est introduit dans les molécules de l'antisérum ou extrait. Après mise en contact avec des hématies, les produits étrangers marqués sont éliminés par lavages répétés. La radioactivité restant sur les érythrocytes est alors déterminée.

Boyd a, de cette façon, tenté une étude de la lectine du haricot de Lima (84) et de *Sophora japonica* (85). Cette méthode n'est cependant guère utilisable malgré la grande sensibilité apportée par le marquage isotopique. Dans le cas du marquage d'un extrait brut ou d'un sérum, certaines fractions, et en particulier les lipides, sont capables d'établir des liaisons non spécifiques avec les hématies ; d'autre part, le lavage des hématies pour éliminer soit des substances étrangères marquées, soit l'hémagglutinine non fixée, conduit à une élution partielle dans des proportions incontrôlables de l'agglutinine précédemment liée aux récepteurs antigéniques. Il ne faut pas oublier en effet que la réaction d'hémagglutination est le plus souvent réversible.

5°) METHODES PHOTOMETRIQUES.

L'hémagglutination ayant atteint l'équilibre, le contenu des différents tubes d'une gamme de dilutions est remis en suspension. Après décantation ou centrifugation à basse vitesse, pendant une durée précise,

les suspensions cellulaires surnageantes sont reprises. La proportion des cellules qu'elles contiennent est estimée par rapport à un témoin, soit directement au spectrophotomètre (86, 87), soit après hémolyse au colorimètre (88).

Sur ce principe est bâti l'Autoanalyseur Technicon : préparations hémagglutinantes et hématies sont intimement mélangées puis les agglutinats sont retirés par piégeage au niveau de tubes en forme de T. Une fois lysées, les cellules libres sont envoyées dans un colorimètre. La diminution de l'intensité de la coloration par rapport à celle obtenue avec une suspension globulaire sans agglutinine est enregistrée graphiquement.

La sensibilité est augmentée par l'addition de substances telle la polyvinylpyrrolidone, favorisant une meilleure séparation des cellules libres et des agglutinats, et par l'adjonction de préparations enzymatiques type broméline, jouant le rôle de «décapant» et faisant apparaître ou augmentant la réactivité des sites antigéniques vis-à-vis de l'agglutinine. De très faibles quantités d'anticorps sont ainsi détectables, et un grand nombre de cellules peuvent être éprouvées rapidement en regard d'une même agglutinine. Les plus nombreuses applications de cette méthode s'adressent à la suite des travaux de Rosenfield (89), à la détection des agglutinines irrégulières dans le sérum des femmes enceintes.

Le principe de l'appareil reposant sur la décantation des agglutinats, et par conséquent sur leur taille, l'autoanalyseur Technicon est utilisable pour des études quantitatives sur des agglutinines de même origine susceptibles de provoquer la formation d'agréats d'hématies de tailles semblables.

Il est plus difficilement employable lorsqu'il s'agit de comparer des hémagglutinines différentes, l'allure des agglutinats ne dépendant pas seulement du titre des préparations, mais de bien d'autres facteurs.

Un problème semblable va se retrouver au niveau des comptages électroniques de particules.

6°) COMPTAGES CELLULAIRES.

- Méthode de Filliti - Wurmser.

Première méthode vraiment quantitative, elle a surtout été appliquée à l'isohémagglutinine anti-B (90).

Lorsqu'une quantité constante d'antisérum et un nombre croissant d'hématies sont mis en présence, le nombre d'hématies agglutinées augmente au fur et à mesure de l'addition de nouvelles cellules, mais seulement jusqu'à un maximum N, dépendant de la température à laquelle on effectue la réaction (N4, N37, si la réaction a lieu à 4° C, à 37° C).

Le N4, nombre d'hématies agglutinables à 4° C par un sérum dans des conditions standardisées, est proportionnel à la concentration de l'agglutinine.

Les expériences sont conduites en tubes scellés. Lorsque l'équilibre est atteint, les cellules libres sont comptées après dilution à l'hématimètre de Thomas.

La détermination du N4 dépasse le cadre d'une simple méthode de titration des agglutinines. Elle a permis une étude thermodynamique véritable de la réaction antigène-anticorps en hématologie : mise en évidence par Filitti-Wurmser et Jacquot-Armand, de la réversibilité quantitative de la réaction d'agglutination des hématies B par l'agglutinine anti-B (90), définition quantitative de la notion d'affinité (91), mise en évidence de différences quantitatives entre des isoagglutinines β issues de différents groupes (92), mesure de chaleurs de réaction (58), étude des antigènes par l'intermédiaire de lectines (91), etc ...

- Méthode de Wilkie et Becker (93)

Comme dans la méthode de titration classique, la préparation agglutinante est diluée géométriquement et à chaque dilution est ajoutée une quantité constante d'hématies de manière à obtenir une concentration finale de l'ordre de 10.000 à 15.000 cellules par mm³. Les conditions

de milieu, pH, composition ionique, température sont soigneusement contrôlées. Après équilibre, les cellules restées libres sont comptées microscopiquement.

Si le taux d'agglutination par rapport à une suspension témoin est porté en fonction du logarithme de la concentration en agglutinine, on obtient une courbe d'allure sigmoïde. En substituant au taux d'agglutination le probit correspondant, apparaît une relation linéaire : la ligne de régression est une droite et le point acceptant pour ordonnée le probit 5 correspond en abscisse, à la quantité d'antisérum ou d'extrait nécessaire pour agglutiner 50 % des hématies. L'unité, dose hémagglutinante 50 % (DH 50), est ainsi définie comme la quantité de préparation non diluée exprimée en ml par ml de dilution, qui agglutine 50 % des hématies présentes dans les conditions de l'expérience.

La force de l'antisérum ou d'une lectine peut être exprimée comme la réciproque de la DH50 ; s'il faut diluer une préparation au 1/Nème pour obtenir une agglutination de 50 % des cellules présentes, 1 ml de cette préparation contient N DH50.

Cette méthode nous est apparue comme la mieux adaptée à nos recherches à cause de sa relative précision, et du matériel simple que demande sa réalisation.

D'autres auteurs l'ont utilisée avec profit, tant pour les dosages des isoagglutinines (étude de l'anti-A et des antigènes A, par Gibbs (94), que pour l'étude quantitative des hémagglutinines d'origine végétale ou animale : recherches de Solomon concernant la spécificité anti-H des extraits d'*Ulex europaeus* (95), travaux de Chatteraj sur diverses lectines anti-A (96). Un point délicat dans la méthode de Wilkie et Becker est le comptage des cellules non agglutinées. Ils emploient, à cet effet, dans leurs travaux originaux, un hématimètre.

Diverses tentatives ont été faites pour introduire une numération par comptage électronique ; d'abord infructueux parce que s'adressant à un appareil à un seul seuil (Coulter A) (97, 98), ces essais ont permis à Bowdler (99) puis à Gibbs (100) d'obtenir, avec les isoagglutinines anti-A et anti-B, des résultats comparables à ceux de la méthode de référence, grâce à un compteur à 2 seuils (Coulter B).

Cet appareil est utilisable dans le système ABO (101, 102, 103) car il est possible de fixer un seuil supérieur pour lequel les cellules libres éliminées sont compensées par les doublets dont la taille est inférieure à l'ouverture correspondant à ce seuil. Toutefois, malgré l'application du Coulter B par Chattoraj (96) au dosage des hémagglutinines extraites de *Phaseolus lunatus*, *Dolichos biflorus* et *Otala lactea*, il nous a paru difficile d'étendre d'emblée le résultat de Gibbs à toutes les agglutinines. Cet auteur a montré qu'avec le système anti-D par exemple, le seuil supérieur était déplacé, sa position dépendant de la capacité des agglutinines à former des doublets (104, 105).

De cette revue rapide des principales méthodes applicables au titrage des hémagglutinines, au cours de laquelle nous avons signalé certains de leurs avantages ou inconvénients, nous retiendrons deux procédés qui, en dehors des moyens simples comme l'agglutination sur lames ou l'emploi de dilutions progressives en tubes que nous avons utilisés pour des dépistages, nous ont servi selon les besoins :

1 - La méthode de Wilkie et Becker, apte à fournir, au prix de manipulations difficiles à pratiquer en longues séries, des résultats qu'on pourrait qualifier d'absolus si l'on pouvait considérer les suspensions globulaires comme des lots homogènes et constants. C'est elle qui nous a permis de doser certaines agglutinines dont nous voulions mesurer les effets sur le comportement des hématies *in vivo*.

2 - La méthode automatique à l'autoanalyser Technicon, très bien adaptée à des études comparatives nombreuses et précises d'une agglutinine donnée placée dans des conditions variées. C'est pourquoi nous l'avons retenue pour l'étude des oses inhibiteurs ou stimulants de certaines agglutinines.

Nous exposerons maintenant, ces deux méthodes en détail, telles que nous les avons appliquées, pour rapporter ensuite nos recherches dans les domaines respectifs où elles nous ont apporté la précision nécessaire.

II - METHODE DE WILKIE ET BECKER.

MATERIEL ET METHODES.

- Préparation des dilutions et suspensions.

Toutes les dilutions et suspensions sont préparées dans une solution tamponnée à pH 7,00 [NaCl 8 g., KCl 0,2 g., MgCl₂ 6 H₂O 0,2 g., NaH₂PO₄ H₂O 0,2 g., Na₂HPO₄ 2 H₂O 0,35 g., H₂O distillée q.s.p. 1 litre] (106).

- Hématies

Les sangs A1 sont recueillis sur 0,2 volume de solution « ACD » [ac. citrique 27 g., soude 7 g., dextrose 57 g., eau distillée 1.000 ml].

Pour la titration des préparations hémagglutinantes destinées à des expériences ultérieures, des mélanges à parties égales de sangs d'au moins 10 donneurs de groupe A1, sont employés.

Les hématies de lapin sont obtenues par ponction au niveau de la veine marginale de l'oreille et recueillies également sur « ACD ».

Pour chaque mélange ou chaque sang, on procède à au moins trois lavages des hématies, à l'aide de la solution tampon. Le plasma doit être soigneusement écarté car il contient des inhibiteurs de l'agglutination, comme l'ont signalé Liener (107, 108), Adamkova (109), Toms (110) et comme nous l'exposerons, en ce qui concerne l'agglutinine de *Lactarius controversus*, à propos de son influence sur la survie des hématies.

- Hémagglutinines.

Toutes les préparations hémagglutinantes sont conservées au congélateur à -30°C . Lors de leur mise en réserve, les éluats sont divisés en plusieurs lots, l'un d'entre eux étant destiné à la titration. Ainsi, les agglutinines destinées à l'expérimentation ou au dosage ne subissent-elles qu'un cycle de refroidissement-décongélation ; il a été montré qu'une succession de congélations et réchauffements modifiait le titre, d'où l'importance de manipuler ces différents lots dans les mêmes conditions. Les éluats sont ramenés à la température de la pièce, juste avant le dosage.

- Verrerie.

La verrerie fait l'objet des précautions indispensables chaque fois qu'on met en oeuvre des réactions d'agglutination ou d'hémolyse : lavage et surtout rinçage soigneux pour éviter tout phénomène parasite.

Les réactions ont lieu en tubes à hémolyse calibrés, de diamètre 11 mm. Les comptages sont faits dans un hématimètre de Malassez dont les rectangles élémentaires correspondent à $0,01\text{ mm}^3$.

- Température d'expérience.

Toutes les manipulations sont pratiquées à une température de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Agitation des mélanges hématies-agglutinines.

Les portoirs de tubes contenant les mélanges réactionnels sont placés sur un agitateur de Kahn réglé sur une fréquence de 275 oscillations par minute, avec une amplitude de 45 mn.

- Prise des clichés.

La cellule de Malassez garnie avec le contenu des tubes de réaction, est placée sur la platine d'un microscope. Un grossissement de 100 diamètres permet de voir entièrement 9 rectangles. Un appareil photographique « Polaroid » raccordé au tube du microscope fournit des clichés à développement instantané.

- Protocole expérimental.

Dilution des éluats :

Après un dosage préalable rapide permettant de cerner la zone de concentrations intéressantes, on procède à des dilutions en progression géométrique de raison 2 encadrant le point d'agglutination 50 %. Chaque tube contient 1 ml de dilution.

Préparation des suspensions d'hématies :

Une mesure de l'hématocrite donne la concentration initiale de la suspension d'hématies lavées ; celle-ci est alors diluée pour que 0,1 ml ajouté à 1 ml de tampon, correspondent approximativement à 15.000 cellules par mm³.

Le nombre exact des cellules contenues dans cette suspension est déterminé à l'hématimètre de Malassez et une nouvelle dilution est alors effectuée de telle sorte que la concentration érythrocytaire dans chaque tube de la gamme soit aussi voisine que possible de 10.000 cellules par mm³.

Il importe que le nombre d'hématies présentes dans le milieu réactionnel soit fixé avec précision car on observe un déplacement de la ligne de régression lié à un changement de pente pour des valeurs s'écartant fortement de 10.000, et, pour des écarts relativement faibles, une simple translation. Toutefois, pour des concentrations allant de 10.000 à 15.000 hématies par mm³, ces écarts minimes n'affectent que légèrement la position de la droite (111). Une teneur en cellules de cet ordre présente également l'avantage d'éviter de diluer ces mélanges pour le comptage, comme l'exige la méthode de Filitti-Wurmser : il nous semble qu'il y a là un avantage considérable de la méthode de Wilkie et Becker, car dans notre cas où, comme l'ont montré les essais de fixation-élution, la réversibilité du phénomène d'agglutination est manifeste, toute dilution faite après la réaction risque d'entraîner des erreurs.

Mise en contact érythrocytes - hémagglutinines :

a) Etude de la résistance des hématies à l'agitation mécanique.

En vue d'étudier la possibilité de destruction mécanique des cellules pendant l'agitation, nous avons examiné le comportement simultané d'hématies de lapin et d'hématies A1 : à 1 ml de solution tamponnée sont

ajoutées des hématies sous un volume de 0,1 ml pour une concentration finale aussi proche que possible de 10.000 cellules par mm³.

Les dilutions réalisées en double exemplaire sont placées sur l'agitateur de Kahn. On compte les hématies présentes au départ, puis sur des parties aliquotes prélevées en double, toutes les heures, pendant 3 heures.

Deux comptages pour chaque tube dans les conditions définies ci-après donnent 4 valeurs dont on fait la moyenne arithmétique.

Les résultats exposés plus loin, ayant montré la fragilité des globules de lapin, nous avons, faute de pouvoir leur appliquer en toute sécurité la méthode de Wilkie et Becker fait l'étude comparée de leur réactivité vis-à-vis des hémagglutinines, par rapport aux hématies humaines, en alternant pendant 4 heures de contact, des périodes de 30 mn de repos et d'agitation, l'agitation durant ainsi 1 heure et demi au total.

b) Dosage des hémagglutinines sur hématies A1.

A chaque dilution et aux tubes témoins est ajoutée 0,1 ml de la suspension d'hématies. Les tubes sont obturés par des membranes paraffinées et placés aussitôt sur l'agitateur mécanique. La durée de l'agitation varie avec l'hémagglutinine considérée : si l'équilibre est atteint en 2 heures et demi avec l'isoagglutinine anti-A et l'agglutinine de *Phaseolus vulgaris*, 3 heures et demi sont nécessaires avec l'agglutinine du lactaire. Certaines phytohémagglutinines demandent un temps de contact encore plus élevé : 6 heures avec *Ulex europaeus* comme l'a montré Solomon (112). Un temps d'agitation insuffisant se traduit par une perte de la linéarité de la ligne des probits.

Nous avons préféré employer la méthode par agitation pour atteindre l'équilibre agglutinats-cellules libres (méthode par agrégation) plutôt que la méthode par dispersion qui consiste à pratiquer une légère centrifugation des tubes avant de les agiter. Avec des sérums tel l'anti-A standard, on parvient au même résultat avec les 2 méthodes, et plus rapidement grâce à la centrifugation (93) ; mais la méthode par dispersion risque de donner des taux d'agglutination plus importants avec des sérums peu avides, ou, et c'est ce qui nous intéresse ici, avec des lectines du type *Ulex europaeus* (88). Pour cette dernière, la réaction avec le site érythrocytaire ne paraît pas totalement réversible.

La vitesse de l'agitation est réglée pour qu'il ne se produise qu'une destruction minimum des hématies présentes. Wilkie et Becker (93) ont montré que l'adjonction de substances protectrices (macro-molécules, albumine bovine) était néfaste puisque pouvant influencer directement sur le taux d'agglutination.

Comptage des cellules libres :

Les contenus des tubes sont remis en suspension par agitation manuelle juste avant qu'une partie aliquote soit transférée dans les 2 chambres d'un hématimètre de Malassez. Le remplissage de la cellule doit se faire très régulièrement.

Après 3 mn et demi de décantation on prend un cliché du centre du quadrillage (113, 114) portant sur 9 rectangles. Les dosages étant réalisés en double, ce sont les cellules libres de 36 rectangles (36 centièmes de mm³) qui sont photographiés et peuvent être aisément dénombrés sur le cliché. Pour les fortes hémagglutinations, les hématies libres, peu nombreuses, sont comptées directement sur toute l'étendue du quadrillage.

Expression des résultats:

Sur un papier semi-logarithmique on porte en abscisse le logarithme des concentrations en agglutinine, et en ordonnée les produits correspondants aux pourcentages d'agglutination.

Pour une ordonnée de 5, la ligne de régression indique sur l'échelle logarithmique la concentration en agglutinine nécessaire et suffisante pour provoquer l'agglutination de 50 % des hématies mises en jeu. Cette concentration peut être lue directement sur le graphique par interpolation ou encore calculée (88).

Le rapport 1/dilution de l'agglutinine en relation avec le probit 5 correspond au nombre de doses hémagglutinantes 50 % présentes dans un ml de la préparation initiale.

Les dilutions sont susceptibles d'apporter des données expérimentales d'autant plus précises, qu'elles sont plus proches du point d'agglutination 50 % et ceci pour plusieurs raisons :

- C'est dans cette zone que la réaction présente un maximum de sensibilité : on le voit sur la courbe sigmoïde dont la pente est plus forte pour une demi-agglutination .

- Pour les fortes concentrations en agglutinine (cellules libres < 10 %), les résultats peuvent être erronés en raison de l'existence d'hématies non agglutinables ; on constate en effet que malgré l'adjonction de nouvelles quantités de sérum ou d'extraits, des cellules restent libres (95).

- Pour les hautes dilutions, il est parfois très difficile de faire une distinction entre les cellules simplement juxtaposées et les cellules réellement agglutinées.

RESULTATS.

1) *Fragilité comparée des hématies de lapin et d'hématies A1-Vitesse de disparition pendant l'agitation des milieux réactionnels :*

TABLEAU III

Hématies	Temps	Nombre de cellules /mm ³	Cellules disparues (%)
A1	0	9.990	
	1 h	9.840	1,5
	2 h	9.770	2,2
	3 h	9.585	4
Lapin	0	10.905	
	1 h	10.120	7,2
	2 h	9.200	15,6
	3 h	7.595	30,4

Les hématies de lapin présentent une fragilité mécanique bien supérieure à celle des hématies humaines.

Le retrait d'un pourcentage aussi important de cellules a une incidence doublement défavorable sur un dosage précis des agglutinines : le nombre d'hématies restant intactes s'écartant fortement du nombre idéal de 10.000 par mm³, la pente et la position de la ligne de régression sont modifiées ; d'autre part, les stromas des cellules détruites soustraient du milieu une quantité inconnue d'agglutinine.

Enfin, il est possible que les cellules libres soient plus fragiles que celles entraînées dans la formation d'agglutinats ou inversement ; une destruction préférentielle entraînera alors une modification dans un sens ou dans l'autre du rapport hématies libres/hématies totales.

Ceci nous a conduit à éliminer les hématies de lapin en tant que matériel de titration des agglutinines, même si ces dernières étaient destinées à entrer en réaction avec ce type de globules.

Les hématies humaines beaucoup plus résistantes, ont été employées à cet effet ; le groupe A1 a été choisi parce que le plus répandu : les titrations étant effectuées sur des mélanges de sang, il importe d'obtenir une réunion d'échantillons en provenance du plus grand nombre possible de donneurs. L'utilisation systématique d'hématies humaines A1 pour le dosage des hémagglutinines présente cependant un inconvénient important, puisqu'il n'est plus possible de comparer les effets, sur les cellules de lapin, d'agglutinines de provenances différentes, la sensibilité des hématies humaines et animales n'étant généralement pas la même.

2) *Comparaison de la force relative d'une même quantité d'agglutinine par dosage sur hématies A1 et hématies de lapin.*

Les lignes de régression concernant les hémagglutinines de *Phaseolus vulgaris* et *Lactarius controversus* sont portées dans les figures 1 et 2.

- *Phaseolus vulgaris* :

La droite obtenue grâce aux hématies de lapin est fortement décalée vers la gauche par rapport à celle tracée à partir des valeurs qui correspondent aux hématies A1. Les globules de lapin sont donc beaucoup plus

sensibles à cet extrait végétal : 250DH50 sur hématies A1 correspondent à environ 1560 DH50 sur hématies de lapin.

Les deux droites étant sensiblement parallèles, nous pouvons comparer directement ces résultats et dire qu'il faut environ 6,2 fois moins d'agglutinine avec des hématies de lapin pour obtenir l'agglutination de 50 % des cellules mises en jeu.

- *Lactarius controversus* :

Vis-à-vis de la quantité d'agglutinine présente dans cette expérience, les réactivités des 2 catégories de cellules ne sont pas très éloignées (60DH50 sur hématies lapin/70DH50 sur hématies A1). Par contre, les pentes des lignes de régression sont différentes. Il n'est donc plus possible de comparer les forces relatives obtenues puisque les valeurs diffèrent avec le taux d'agglutination.

3) Lignes de régression correspondant à des lots différents d'une même agglutinine.

Des hématies A1 sont employées pour tous les dosages. Les résultats correspondent à diverses concentrations de 3 hémagglutinines :

- isoagglutinine anti-A
- *Phaseolus vulgaris*
- *Lactarius controversus*.

Les valeurs expérimentales sont portées graphiquement dans les figures 3 à 5. Pour chaque catégorie d'hémagglutinine, les lignes de régression sont parallèles ; la concentration en agglutinine n'a donc pas d'influence sur la pente.

Si l'on compare les résultats ayant trait aux 3 hémagglutinines, on constate que les droites sont plus ou moins redressées : la pente la plus forte correspond à la mycoagglutinine et la plus faible à la P.H.A.

L'isoagglutinine et la P.H.A. conduisent d'ailleurs à des pentes peu différentes.

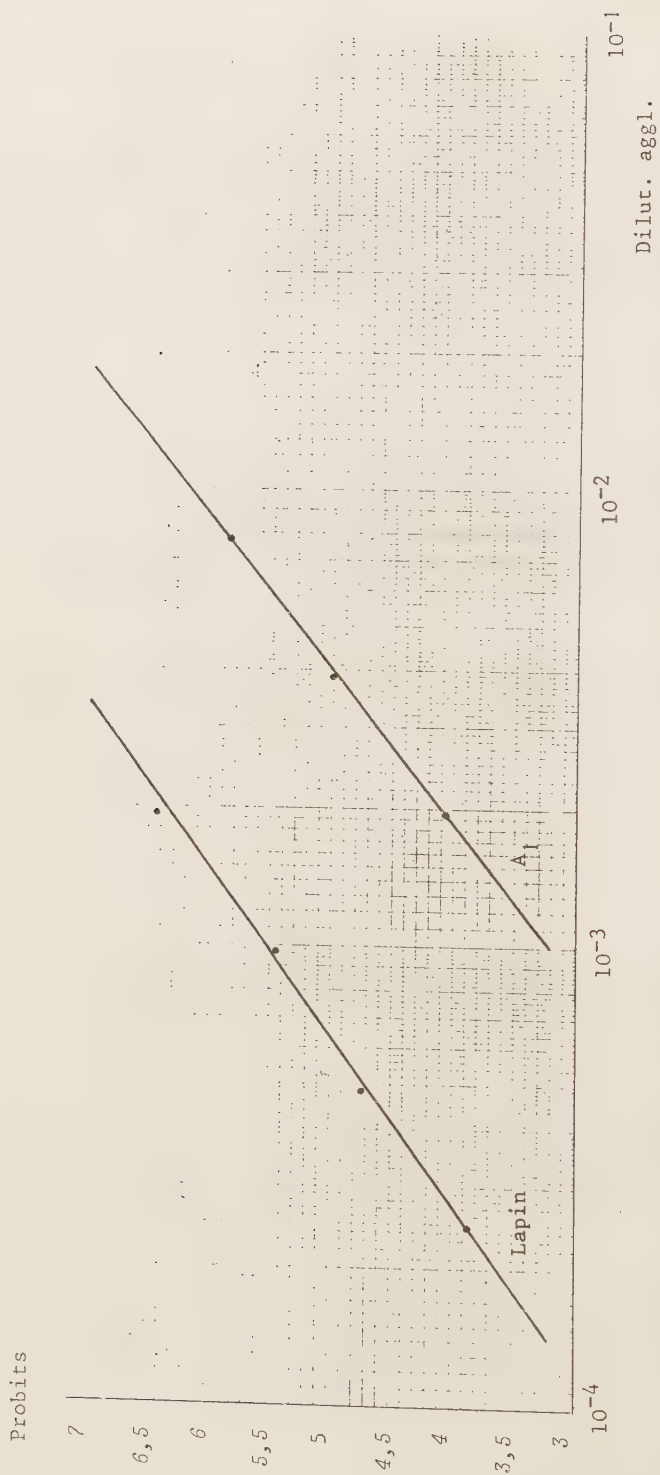


Fig. 1 - Comparaison de la force relative de l'agglutinine de Phaseolus vulgaris titrée sur hématies Al et hématies de lapin

Probits

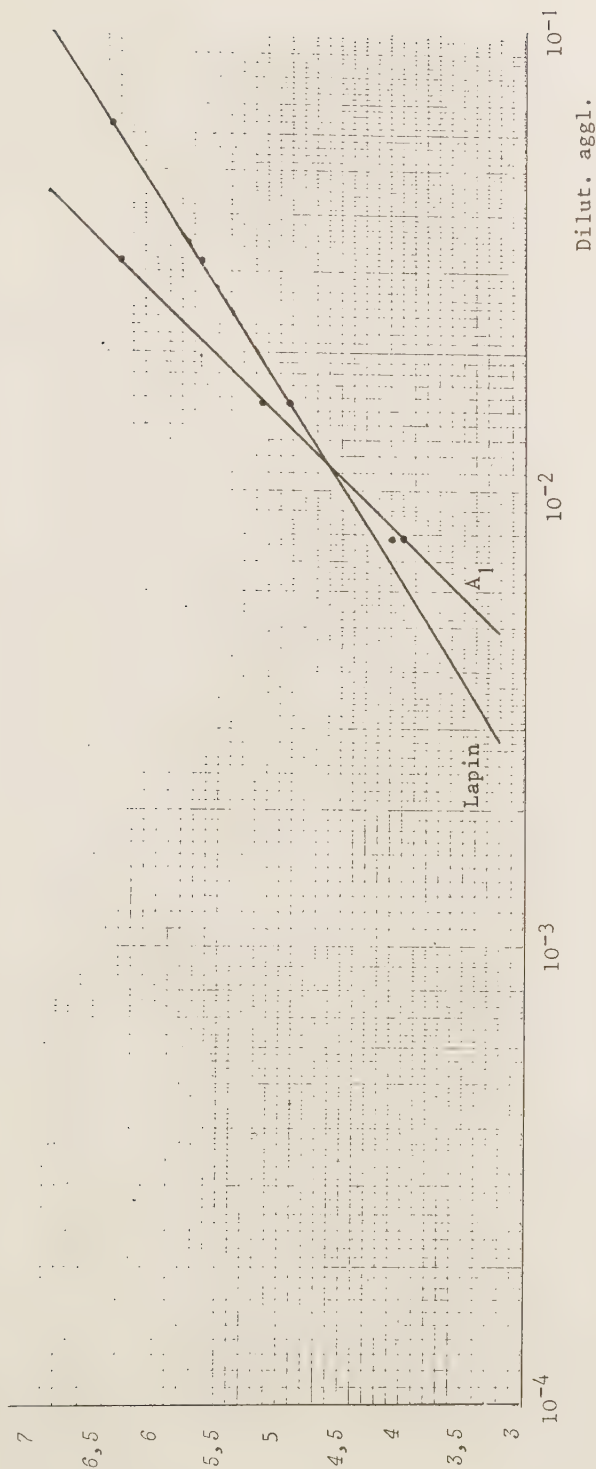


Fig. 2 - Comparaison de la force relative de l'agglutinine de Lactarius controversus titrée sur hématies A1 et hématies de lapin

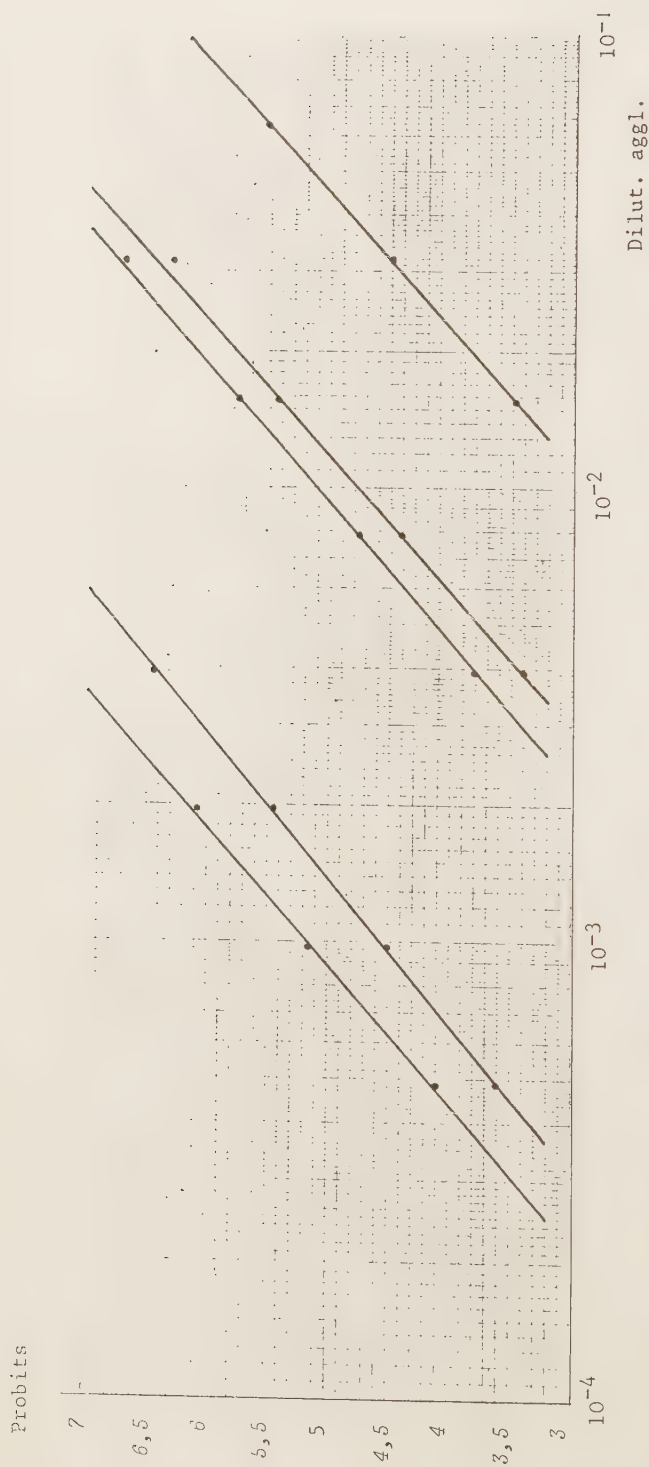


Fig. 3 - Comparaison de 5 échantillons d'isoagglutinine anti-A titrés sur hématies A1

Probits

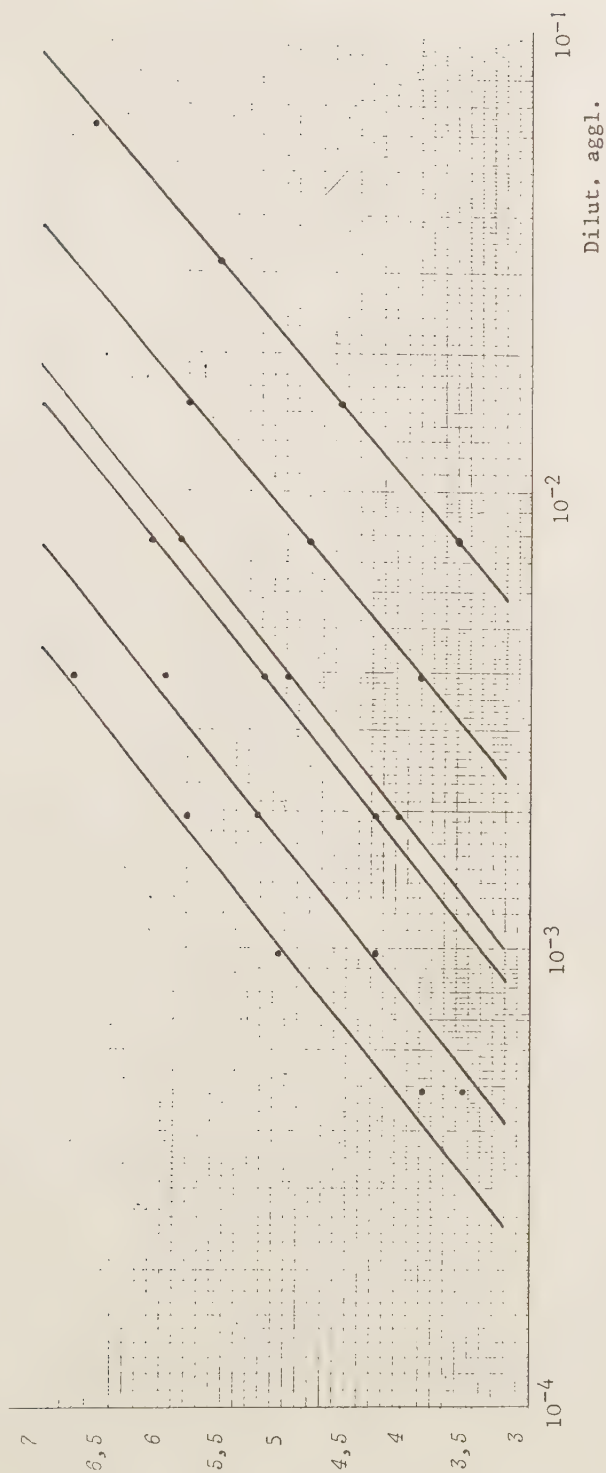


fig. 4 - Comparaison de 6 échantillons d'agglutinine de Phaseolus vulgaris titrés sur hématies Al.

Probits

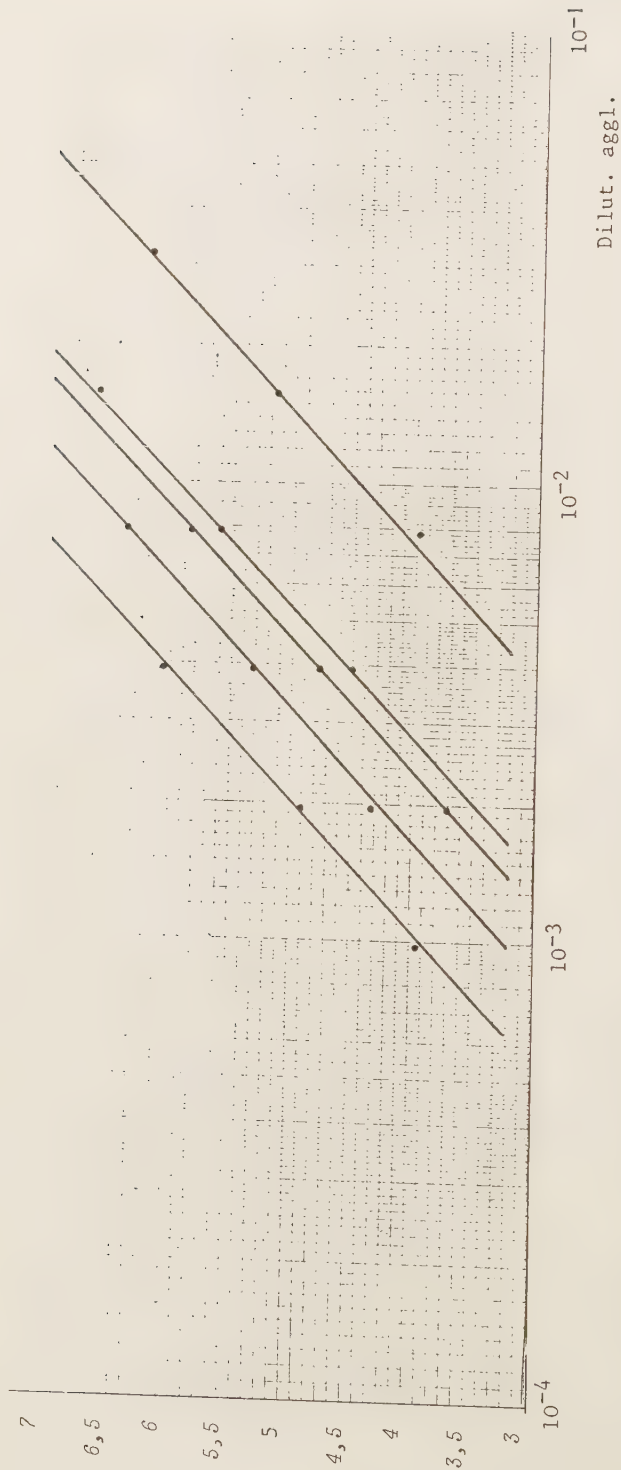


Fig. 5 - Comparaison de 5 échantillons d'agglutinine de *Lactarius controversus* titrés sur hématies Al

III - METHODE AUTOMATIQUE

D'APRES ROSENFELD

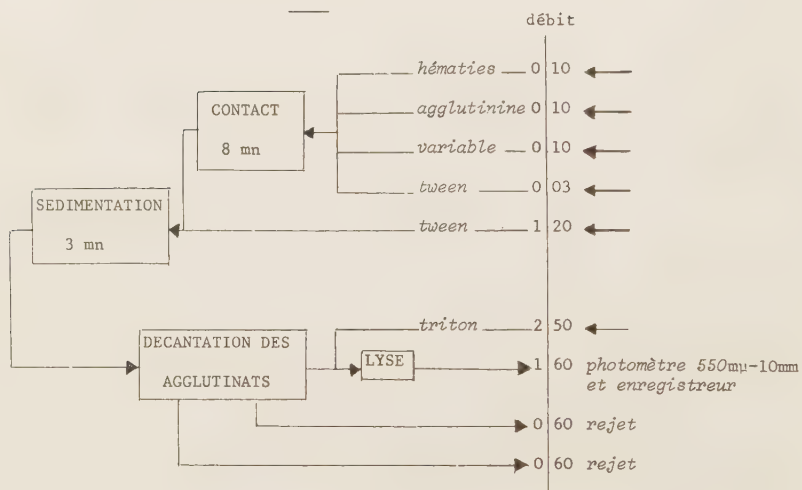
La méthode préconisée par Rosenfield (89) utilise l'appareillage Technicon pour réaliser des conditions très reproductibles dans lesquelles se développe le phénomène d'agglutination.

On associe à parties égales l'agglutinine, les hématies en suspension riche, la solution de la substance dont les effets sont étudiés, (ou pour des témoins et étalons, une simple solution saline). Ce mélange caractérisé par sa haute teneur en hématies, est maintenu 8 mn en contact pour assurer la fixation de l'agglutinine. Il est ensuite additionné d'une solution de « Tween » (Tween 20) qui facilite la sédimentation des agglutinats. Ceux-ci sont éliminés par deux trappes successives, et la suspension d'hématies restées libres est traitée par un agent lytique, le Triton X 100, puis conduite au photomètre enregistreur où est mesurée la transmission de la lumière à 550 m μ sous 10 mm.

La distribution des réactifs, les flux suivant lesquels ils sont acheminés et le déroulement des opérations sont définis dans le schéma ci-après, qui caractérise le « manifold » utilisé. Nous avons jugé superflu d'y faire figurer les flux d'air destinés à segmenter les liquides (fig. 6).

figure 6

Schéma de Montage de l'Autoanalyseur



- Réactifs.

Hématies :

La suspension est préparée à partir d'hématies humaines de groupe A₁, par dilution d'un culot globulaire dans une solution saline contenant du Ficoll comme agent protecteur [Ficoll 5 g., NaCl 9 g., eau 1000] La richesse de cette suspension est fonction de la sensibilité désirée.

Agglutinine :

La méthode ayant servi à l'étude des inhibiteurs et stimulants éventuels d'agglutinines de divers mycètes, dont la purification n'était pas toujours possible par fixation-élution, nous avons utilisé des extraits aqueux, précipités par (NH₄)₂ SO₄ à 70 g. p. cent, le précipité recueilli étant ensuite redissout et ramené à l'isotonie par dialyse contre NaCl à 0,9 g. p. cent.

Variable :

Nous entendons par là la substance éventuelle dont l'action sur l'agglutinine est mise à l'étude. Pour les titrages préalables, on apporte par cette voie une simple solution saline. Pour les essais, les oses ou les substances apparentées ont été introduits en solution à 2 g. p. cent dans l'eau salée isotonique, dans la mesure de leur solubilité.

Tween :

La solution est obtenue en ajoutant II gouttes de Tween 20 à 1 litre de solution saline isotonique.

Triton :

On emploie une solution aqueuse à 0,5 g. p. cent.

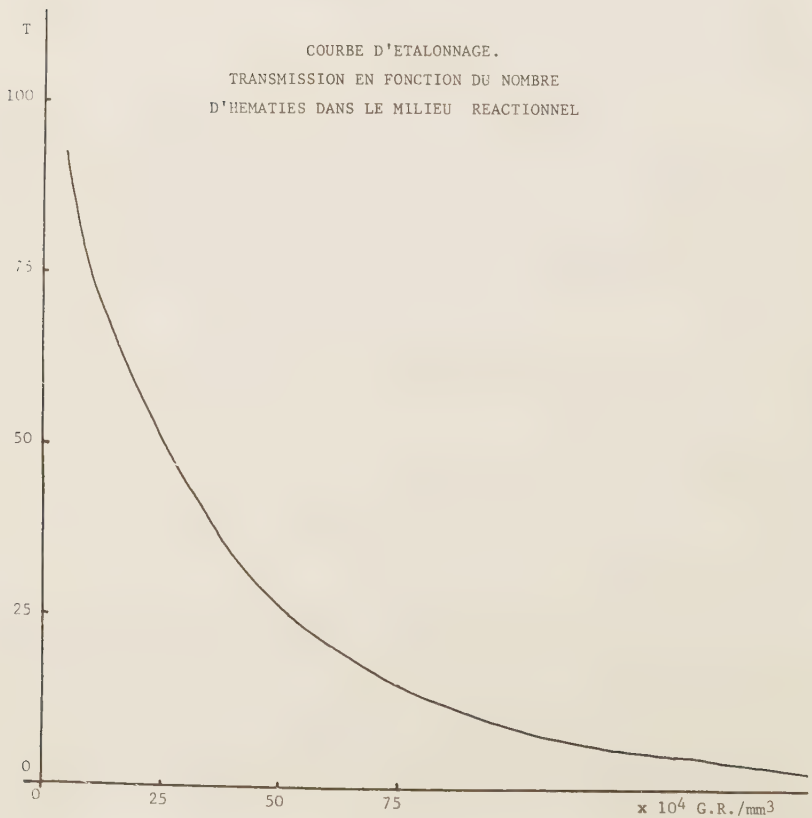
Liquide de lavage :

L'appareillage nécessite un entretien soigneux, en raison de la tendance des protéines à s'adsorber sur les parois des bobines de verre, et de celle des hématies à se fixer sur les agglutinats arrêtés accidentellement en cours de circuit. Le lavage systématique se fait avec une solution de « lessive aux enzymes », et les microcaillots de fibrine qui viennent parfois gêner ou arrêter le courant sont éliminés par NaOH à 10 g. p. cent.

- Etalonnage.

L'appareil est étalonné par introduction de suspensions globulaires connues, en l'absence d'agglutinine. Les phénomènes de fixation de l'agglutinine et d'intervention des éventuels inhibiteurs ou stimulants se déroulant dans la bobine de contact, nous avons, au cours de l'étalonnage par des suspensions variées successivement mises en jeu, mesuré la concentration globulaire par des prélèvements à l'entrée de cette bobine. L'étalonnage dont les résultats sont figurés par la courbe ci-dessous, exprime la transmission en fonction de la richesse globulaire dans le milieu réactionnel (fig.7).

FIGURE 7



- Protocole expérimental.

Les déterminations quantitatives que nous avons effectuées ont eu pour but, soit de titrer les agglutinines, soit de mesurer l'influence des substances inhibitrices ou adjuvantes, sur l'activité de ces agglutinines. Dans un cas comme dans l'autre, le dispositif précédemment schématisé est utilisé, et la solution considérée (agglutinine ou ose) est apportée, à des dilutions progressives, par le distributeur automatique d'échantillons.

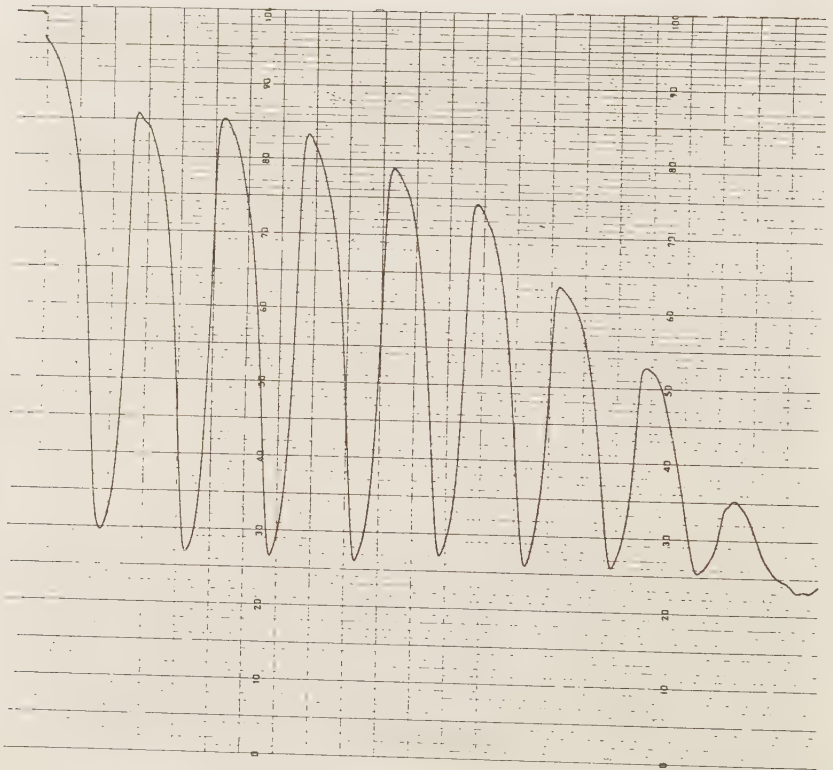
La réponse de l'électrophotomètre est traduite sur l'enregistreur par une courbe de transmission : en l'absence d'agglutinine, la transmission observée reflète la richesse de la suspension globulaire utilisée et l'allure exponentielle de la courbe d'étalonnage indique que la sensibilité dépend de cette concentration. La notion de N, selon Filitti et Wurmser (90) que nous avons précédemment définie (p. 26), implique naturellement que la révélation de plusieurs agglutinines différentes ne puisse pas être obtenue avec le maximum de sensibilité si l'on n'utilise qu'une seule et même concentration globulaire. Or nous n'avons pas en vue, ici, un dépistage systématique d'agglutinines : la méthode est appliquée à la recherche d'éventuels inhibiteurs ou stimulants et la concentration en agglutinine active va donc varier au cours même de la série d'essais. On pourrait alors envisager d'opérer à l'aide d'agglutinines à des taux entraînant l'agglutination de 50 % de globules mis en jeu, mais l'influence des inhibiteurs risquerait d'être, dans certains cas, difficile à déceler puisque les hématies soustraites à l'agglutination s'ajouteraient à la moitié restée libre des globules.

C'est finalement à un compromis qu'il faut aboutir, pour mener une étude systématique de l'action de nombreuses substances osidiques sur diverses agglutinines : la suspension globulaire est dosée de manière à ce que même ses variations modérées soient perceptibles et qu'ainsi elle traduise avec assez de sensibilité l'action des inhibiteurs puissants. Nous y sommes parvenu en utilisant comme suspension globulaire un mélange d'1 partie de culot globulaire pour 3 de solution saline, qui nous a permis d'aboutir à une transmission toujours voisine de 25. La concentration de l'agglutinine est amenée dans la zone où le maximum des hématies de la suspension est agglutiné, tout accroissement d'agglutinine ne modifiant pratiquement pas le pourcentage d'agglutination : on dispose ainsi

d'une large gamme dans la détermination des inhibiteurs faibles, sans supprimer la possibilité d'une mise en évidence des effets stimulants. Une telle concentration est choisie à partir d'une courbe de titrage comme celle que nous présentons ci-dessous :

FIGURE 8

Enregistrement d'un titrage de l'agglutinine de *Lactarius controversus*.

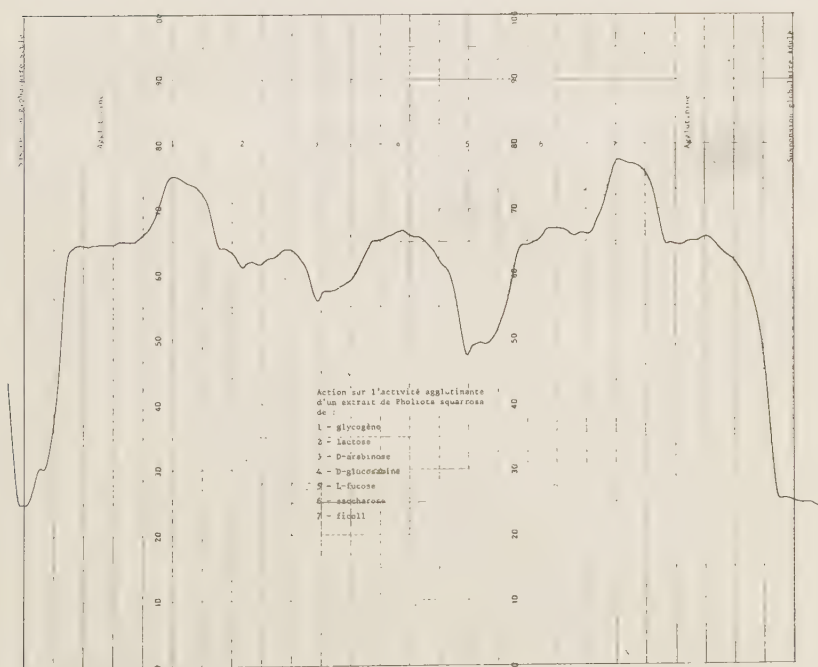


- Expression des résultats.

A partir des transmissions relevées sur l'enregistreur, au niveau des pics correspondant aux échantillons délivrés par le distributeur, et de la courbe d'étalonnage, on exprime l'activité agglutinante en pourcentage d'hématies agglutinées par rapport aux hématies mises en jeu. Le fragment de courbe ci-après permet de se rendre compte des variations de l'activité d'une agglutinine, dans les conditions que nous venons de décrire, sous l'influence de diverses substances.

FIGURE 9

Action sur l'activité agglutinante d'un extrait de *Pholiota squorrosa* de quelques oses et polysaccharides.



ETUDE DE LA SURVIE DES HEMATIES DE LAPIN

APRES TRAITEMENT

PAR LES HEMAGGLUTININES.

Plusieurs travaux ont été consacrés au sort, dans l'organisme d'hématies ayant subi in vitro l'action d'anticorps dirigés contre les antigènes de surface (116, 117, 118, 119) ou encore le contact de virus agglutinants (120, 121).

Ces expériences conduites chez l'homme ou chez l'animal (rat, lapin, chien) ont permis de préciser l'importance du phénomène d'élyution de l'agglutinine dans la survie des érythrocytes (122), ainsi que les rôles respectifs de la rate et du foie dans le retrait des cellules sensibilisées (123).

Dans tous les cas, le devenir des hématies normales ou modifiées a pu être suivi avec profit grâce à l'utilisation de marqueurs radioactifs le ^{51}Cr étant le plus communément employé.

De la même façon, nous nous sommes appliqué à déterminer, en utilisant le lapin comme animal d'expérience, si des hématies mises en présence d'agglutinines végétales étaient condamnées à court terme ou étaient en mesure de survivre normalement, au moins pour une partie d'entre elles.

1°) PROCÉDES DE MARQUAGE.

Le marquage des hématies, destiné à permettre de suivre leur sort dans l'organisme, fait appel, soit à une particularité antigénique, qui peut conduire à une agglutination différentielle, soit à l'incorporation d'un radioisotope aisément repérable. Dans le premier cas, on doit mettre en jeu des hématies hétérologues et cette nécessité interdit l'utilisation du procédé pour une étude de la survie des érythrocytes. C'est donc au deuxième principe que nous avons eu recours.

Nous avons employé deux techniques de marquage des hématies, l'une faisant appel au ^{51}Cr sous forme de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ (marquage in vitro), l'autre au ^{32}P sous forme de DF^{32}P , diisopropylfluorophosphate (marquage in vivo),

1 - Marquage par le chrome radioactif.

C'est en 1950 que Gray et Sterling (123) mettent en évidence les qualités de l'isotope ^{51}Cr pour marquer les hématies et décrivent une technique appelée à remplacer la méthode d'agglutination différentielle d'Ashby (124). Les globules rouges mis au contact de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ absorbent rapidement le chrome radioactif qui se fixe sous forme trivalente au niveau de la fraction globulinique de l'hémoglobine (125, 126).

Les avantages offerts par cette technique sont multiples :

- Le chrome trivalent n'est pas réutilisé lors de la mort de l'hématie, contrairement au ^{59}Fe , car seul l'ion hexavalent traverse la membrane cellulaire.
- Ce métal n'est pas toxique pour les cellules marquées tant que les doses restent inférieures à $5\text{ }\mu\text{g}$ par ml de sang.
- Mis en présence d'une population cellulaire, il ne manifeste pas de préférence en rapport avec l'âge des hématies ; certains auteurs (127) ont cependant noté que les érythrocytes âgés étaient un peu moins aptes que les jeunes à retenir le marqueur.
- Le ^{51}Cr émettant un rayonnement γ de 237 KeV, la mesure de la radioactivité des échantillons à l'aide d'un compteur à scintillations n'offre aucune difficulté.

- Enfin la période physique du ^{51}Cr étant de 27 jours et demi, il est facile de suivre avec une bonne précision, le devenir des cellules injectées au lapin jusqu'à leur complète disparition qui a lieu au bout de 60 jours.

Toutefois le ^{51}Cr présente un inconvénient majeur, celui de s'éluier des hématies. Dès 1953, Ebaugh et coll. (128) ont constaté par utilisation simultanée de l'agglutination différentielle, que le chrome disparaissait plus vite que les hématies marquées. Si la vitesse d'éluion est plus forte dans les premières 24 heures suivant la ré-injection elle reste heureusement constante par la suite, sauf dans certains états pathologiques (129). Ce phénomène d'éluion retentit sur les courbes de survie établies à partir de la radioactivité présente dans la circulation en fonction du temps.

Pour des sujets normaux, ces courbes admettent deux composantes :

- une résultant de la destruction par sénescence des globules marqués,
- l'autre correspondant à l'éluion du chrome aux dépens des mêmes cellules.

Si le premier processus agissait seul, le tracé correspondrait à une droite et le nombre de cellules présentes au temps t serait donné par la formule :

$$N_t = N_0 (1 - at)$$

où N_0 est le nombre de globules marqués à l'origine et a le coefficient de disparition des globules par vieillissement, avec $a = 1/T$, T étant la durée de vie maximum des hématies transfusées.

Si maintenant le deuxième processus était le seul en cause, en supposant que les hématies puissent persister indéfiniment dans la circulation, la radioactivité au temps t , soit N_t découlerait de la formule :

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

avec N_0 la radioactivité à l'origine et k le coefficient correspondant à l'intensité de l'éluion.

Il en serait de même si ces globules d'une durée de vie théoriquement illimitée, étaient soumis à un processus hémolytique frappant les cellules au hasard, sans distinction d'âge (130).

Puisqu'en réalité, vieillissement des globules et élution du chrome s'opèrent simultanément, le pourcentage de radioactivité présent au temps t est donné par la relation :

$$N_t = N_0 (1 - at) e^{-kt}$$

Si l'on trace la courbe des valeurs expérimentales en coordonnées semi-logarithmiques on n'obtient pas une droite (131). Cependant, pour des temps d'expérimentation relativement courts, la formule peut s'écrire $N_t = N_0 e^{-kt}$, formule dans laquelle le coefficient k correspond à la fois au taux d'élution et à la durée de vie réelle des globules rouges ; nous obtenons alors sur papier semi-logarithmique une droite sur laquelle nous pouvons déterminer la demi-vie apparente des hématies qui correspond au moment où la moitié de la radioactivité circulante a disparu.

2 - Marquage par le DF³²P.

Le diisopropylfluorophosphate se combine irréversiblement avec la tributyrinase et la cholinestérase présentes au niveau de la membrane globulaire, en les inactivant.

La méthode de marquage par le DF³²P décrite pour la première fois en 1954 par Cohen et Warringa (132), est moins utilisée que la précédente, car la détection des radiations β du ³²P dont l'énergie est égale à 1,71 MeV (100 %), présente quelques difficultés.

Du fait de son affinité pour les enzymes estérasiques, on emploie également le DF³²P pour étudier la durée de vie de cellules d'âge déterminé : en injectant préalablement de fortes doses de DFP non marqué, on bloque la cholinestérase de toutes les hématies présentes. L'injection postérieure de DF³²P marque simplement les cellules nées après la première administration du produit (133).

Le marquage peut se réaliser soit in vitro, soit in vivo ; la technique qui consiste à injecter le DF³²P par voie intraveineuse est cependant la plus fréquemment employée (134, 135, 136).

Durant une période de 3 à 4 jours après l'injection, une quantité importante de la radioactivité disparaît ; cependant ce phénomène ne se manifeste pas toujours pour les hématies humaines (137, 138). Par la suite, le tracé des courbes de survie apparaît rectiligne pour des cellules normales, au moins chez l'homme (134, 139, 140, 141) et les animaux soumis jusqu'à présent à l'expérimentation (136, 142, 143). Hjort et coll. (144) supposent que le principal facteur de cette élution précoce est une surcharge des globules rouges en DFP.

2°) MATERIEL ET METHODES.

1 - Etude de la survie des hématies de lapin marquées et sensibilisées in vitro.

Des lapins mâles et femelles pesant environ 2 kg 500 sont répartis en plusieurs lots, les animaux de chaque lot recevant la même nourriture.

a) Marquage des cellules :

Lapins témoins : 7 ml de sang sont prélevés stérilement au niveau de la veine marginale de l'oreille sur 2 ml de solution « ACD ».

Après ajustement de l'hématocrite à 35 %, $50\mu\text{Ci}$ de $^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$ correspondant à $1,46.10^{-4}$ mg de chrome métal, sont ajoutés à 6 ml de la suspension. Le mélange est mis à incuber pendant 1 heure à 37°C , puis les hématies sont lavées 3 fois avec un égal volume d'une solution stérile de NaCl à 9 g p. 1000. Le volume initial est ensuite rétabli par addition de solution saline isotonique contenant 10 mg d'acide ascorbique, en vue de réduire à l'état trivalent le chromate non fixé par les globules. 5 ml exactement de cette suspension sont réinjectés dans la veine de l'oreille. On détermine la radioactivité totale injectée sur une partie aliquote de 0,5 ml de cette suspension.

Lapins traités : on procède au marquage des hématies de la même façon que pour les témoins, mais le tube contenant les 6 ml de suspension de globules marqués reçoit 10 ml de la solution de phyto-hémagglutinine dont on se propose d'étudier les effets.

Le mélange est porté à l'étuve à 37° C pendant une heure et agité par retournement à plusieurs reprises. La température de 37° C n'est pas la plus favorable à une fixation optimum de l'agglutinine, mais elle correspond aux conditions présentes in vivo.

Après centrifugation, le liquide surnageant est remplacé par une même quantité de solution saline isotonique. Après remise en suspension des cellules, on centrifuge pendant 3 mn à vitesse lente, à température de la pièce, pour récupérer le culot ; on ne pratique qu'un seul lavage dans les conditions définies ci-dessus, pour éviter une élution in vitro des phytohémagglutinines.

Le volume contenant toutes les hématies est ramené à 6 ml. On prélève 5 ml d'hématies sensibilisées pour l'injection. De la même façon, 0,5 ml de cette suspension permettent de connaître la radioactivité totale injectée.

Nous avons pris comme radioactivité sanguine initiale des lapins traités celle des lapins témoins, compte tenu de l'activité totale injectée à chacun des animaux, car il peut se produire une destruction ou un retrait brutal des hématies traitées avant dilution complète du produit marqué dans le torrent circulatoire. Les lapins des différents lots ayant sensiblement le même poids, nous avons considéré que leurs masses sanguines occupaient des volumes analogues.

b) Phytohémagglutinines :

Les préparations conservées à - 20° C sont décongelées et ramenées à température de la pièce, juste avant leur utilisation. Elles sont ajoutées aux hématies sous un volume constant de 10 ml.

Agglutinine de *Phaseolus vulgaris* : Deux doses différentes ont servi à cette étude. Les 6 ml de suspension ont reçu :

- soit 1 ml de phytohémagglutinine ajustée à 100 DH 50 par ml + 9 ml de solution saline stérile.
- soit 10 ml d'agglutinine ajustée à 100 DH 50 par ml.

Après une heure de contact à 37° C, les suspensions ayant reçu la dose faible présentent quelques fins agglutinats visibles microscopiquement, mais une grande proportion de cellules restent libres.

Au contraire, les cellules ayant reçu la dose forte sont massivement agglutinées.

Dans les 2 cas, après l'action de l'agglutinine, le surnageant ne contient apparemment pas d'hémoglobine.

Agglutinine de *Lactarius controversus* : deux doses ont été étudiées :

- soit 1 ml de phytohémagglutinine à 100 DH 50 par ml + 9 ml de solution saline stérile.
- soit 10 ml de phytohémagglutinine à 100 DH 50 par ml.

On ne constate pas, ici non plus, d'hémolyse après contact à 37° C. Les cellules mises en contact avec la dose faible restent libres après contrôle microscopique, alors que la dose forte provoque une importante agglutination.

Agglutinine de *Boletus subtomentosus* : elle appartient au groupe des mycoagglutinines non éluables par les procédés habituels. L'extrait non purifiable par élution thermique est utilisé brut. Du fait de son impureté et de son incompétence à entrer dans les réactions d'agglutination réversibles, nous nous sommes contenté de doser cette préparation fongique par la méthode des dilutions géométriques, en présence d'hématies A1.

Nous avons également utilisé ici deux doses différentes d'agglutinine :

- soit 1 ml d'un extrait agglutinant environ au 1/50e + 9 ml de solution saline stérile,
 - soit 10 ml de cet extrait
- ont été ajoutés aux hématies de lapin.

Une légère hémolyse est visible dans les eaux du lavage visant à éliminer la partie de l'extrait non fixé sur les hématies, dans le cas de la dose forte.

De rares agglutinats sont décelables au microscope après contact avec la dose faible ; la dose forte provoque la formation de gros agglutinats auxquels participe la presque totalité des hématies mises en jeu.

c) Prélèvement et comptage des échantillons :

Des échantillons de sang de l'ordre de 0,75 ml sont prélevés sur héparine au rythme suivant :

Lapins témoins : dans toutes nos expériences, nous avons pris comme valeur 100 la radioactivité des échantillons prélevés 1 heure après l'injection des érythrocytes marqués ; des prises de sang sont effectuées tous les jours pendant la première semaine, puis à des intervalles plus espacés, atteignant un prélèvement hebdomadaire, jusqu'à ce que la radioactivité s'annule.

Lapins traités : le premier prélèvement est fait 10 minutes après l'injection des hématies marquées. Ceci a pour but de contrôler une éventuelle destruction cellulaire survenant dès la remise en circulation des hématies sensibilisées ; on admet avec Hughes-Jones (145), et Gardner (120) qu'un laps de temps de 10 mn est suffisant pour répartir d'une façon homogène dans le torrent circulatoire, les cellules marquées.

Leur survie est ensuite étudiée par des contrôles journaliers puis hebdomadaires.

On prend soin de ne pas recueillir les premiers échantillons de sang au niveau de l'oreille où s'est faite la réinjection.

La radioactivité est mesurée sur des volumes aliquotes de 0,5 ml de sang total à l'aide d'un appareil de mesure automatique γ par scintillations solides (cristal de Na I (T1). Nuclear Chicago). L'hématocrite, dont la valeur se modifie en fonction, soit des variations naturelles de la concentration érythrocytaire au cours des 2 mois d'expérimentation, soit des conditions de prélèvement, permet de corriger les résultats en les rapportant à la masse globulaire initiale.

Aucune correction n'a été apportée concernant la radioactivité plasmatique ; nous n'avons pas tenu compte des volumes et activités retirés par l'échantillonnage.

Aucun lapin n'a présenté de choc après injection des cellules sensibilisées.

En vue de rechercher les sites organiques du retrait des hématies agglutinées, un des lapins traité par la dose forte d'agglutinine de *Boletus subtomentosus* a été sacrifié 3 heures après l'injection des cellules marquées.

Après une détermination scintigraphique dans l'espoir de localiser sur l'animal vivant les zones de forte radioactivité, selon les techniques exposées plus loin, nous avons prélevé sur l'animal, les organes suivants : poumons, coeur, rate, foie, reins, ainsi qu'une partie aliquote de sang total.

Une fois pesés, ces différents organes ont été homogénéisés par broyage et une quantité voisine de 0,5 g destinée au comptage, placée dans un tube approprié.

Le sang contenu dans les cavités cardiaques a été éliminé par lavage avant que le coeur ne soit broyé.

d) Scintigraphie :

Deux heures après l'injection de ses propres hématies agglutinées par une forte dose d'agglutinine de *Boletus subtomentosus*, le lapin a été placé sous le cristal d'une camera à scintillation, Mark II Nuclear Chicago, qui nous a fourni des clichés repérés où sont visibles les régions les plus riches en ^{51}Cr .

2 - Etude de la survie des hématies de lapin marquées et sensibilisées in vivo.

a) Marquage des cellules :

Pour cette expérimentation, nous avons utilisé un lot de lapins « Fauves de Bourgogne » d'un poids moyen de 2 kg.

10 μCi de DF^{32}P sont injectés dans la veine marginale de l'oreille. Cette activité correspond à une quantité de $5,5 \cdot 10^{-2}$ mg de diisopropylfluorophosphate. Le DF^{32}P présenté en solution dans du propylène

glycol stérile, est dilué par une solution saline isotonique au moment même de l'injection pour éviter une hydrolyse de ce produit, extrêmement fragile, en diisopropylphosphate.

b) Prélèvement des échantillons :

Environ 0,80 ml de sang sont retirés chaque fois au niveau de l'oreille et recueillis sur héparine, en prenant les mêmes précautions que précédemment pendant les premiers jours.

Les prélèvements se font toutes les 24 heures, le premier une heure après l'injection du marqueur, puis quotidiennement pendant environ 10 jours, et enfin une fois par semaine, jusqu'à disparition de la radioactivité circulante.

c) Comptage des échantillons :

Chaque prélèvement est lavé 3 fois dans 50 volumes de solution saline isotonique. On s'efforce de retirer par aspiration, la majorité des globules blancs à la surface du culot.

Les hématies sont remises en suspension dans suffisamment de solution saline pour obtenir un volume d'environ 0,50 ml et la proportion des cellules présentes est déterminée par lecture de l'hématocrite.

On ajuste alors la concentration cellulaire à exactement 30 p. cent à l'aide de pipettes de précision et 0,50 ml de la suspension sont placés sur une plaque d'aluminium de 30 mm de diamètre. A ces 0,50 ml on ajoute 0,20 ml d'eau distillée pour hémolyser et une goutte de glycérol. On agite et on étale très soigneusement le mélange avec un fil de verre.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37° C, l'étalement se montre parfaitement homogène, le glycérol servant de liant évite le craquellement et le décollement de la couche mince provenant des hématies lysées.

La radioactivité est mesurée grâce à une échelle de comptage de rayonnement β , à bas bruit de fond (Nuclear Chicago).

d) Administration de l'agglutinine :

10 ml d'une solution d'agglutinine de *Lactarius controversus* à 1.000 DH 50 sont injectés lentement par la veine marginale de l'oreille de chacun des lapins du lot destiné aux essais, 6 jours après le marquage des hématies.

Ce délai permet d'éviter que le phénomène initial d'élution n'interfère avec l'éventuelle destruction des hématies par l'agglutinine injectée.

3 - Influence du sérum de lapin sur l'héماغglutination.

Les agglutinines purifiées de *Lactarius controversus* et *Phaseolus vulgaris*, ainsi que l'extrait brut de *Boletus subtomentosus*, sont dilués géométriquement

- soit au moyen d'eau physiologique,
- soit au moyen de sérum de lapin.

A chaque dilution représentant une quantité totale de 0,5ml est ajoutée une goutte d'une suspension d'hématies à 4 %. Les cellules sont issues du même animal que le sérum.

Chaque expérience est réalisée en double, une série de portoirs étant placée à température de la pièce, l'autre à 37° C .

On lit le titre de l'agglutination après 2 heures de contact. 0,5 ml de sérum de lapin est alors ajouté à chaque tube, et les portoirs sont soigneusement agités et maintenus à 20° C et à 37° C pendant 24 heures. Une lecture de l'agglutination est faite après 2 h et 24 h, et comparée au résultat du titrage initial.

3°) RESULTATS.

1 - Marquage des hématies par le ⁵¹Cr et sensibilisation in vitro.

a) Durée de vie des hématies normales.

Les courbes correspondant à la décroissance de la radioactivité par rapport au temps sont portées dans la fig. 10.

En ordonnée sont indiqués les pourcentages de radioactivité, le prélèvement effectué une heure après la réinjection étant choisi comme indice 100. Les courbes atteignent l'axe des temps entre 56 et 63 jours. Cette valeur moyenne de 60 jours pour la durée de vie maximum des hématies de lapin, concorde avec les résultats d'autres auteurs, dont Paoletti (146), Benard et coll. (147), Gardner et coll. (120), Brading et coll. (148), qui ont utilisé le ^{51}Cr comme marqueur. Toutefois, Sutterland et coll. (149), après marquage au chrome, et Neuberger et Niven (150), après administration de glycocolle à l'azote lourd, donnent des valeurs normales allant de 62 à 70 jours, alors que Harrison et coll. (151) obtiennent des valeurs avoisinant 50 jours grâce au ^{55}Fe .

De même, nos résultats sont parallèles avec d'autres, en ce qui concerne la demi-vie apparente, les valeurs calculées graphiquement se situant entre 11 et 15 jours ; le tableau suivant indique les demi-vies apparentes obtenues chez des lapins normaux d'après différents auteurs :

Shumway et coll	(152)	10,5 à 17 jours
Evans et coll.	(153)	14 $\pm$ 2 jours
Clausen et Larsen	(154)	8 à 17 jours
Holmes et coll.	(155)	12 jours
Sroczyński et coll.	(156)	11,5 $\pm$ 2,2 jours

Pour connaître le taux d'éluion E du ^{51}Cr des hématies normales on multiplie les valeurs des pourcentages du ^{51}Cr aux différents temps t , par le coefficient $\frac{60}{60-t}$. On trace ensuite, en coordonnées semi-logarithmiques, la courbe $E = f(t)$. Seuls les pourcentages correspondant à une période de 0 à 30 jours ont été pris en considération.

A partir de la ligne de régression dont la position est ajustée par la méthode des moindres carrés (157), on calcule graphiquement le temps au bout duquel la moitié du ^{51}Cr est éluee, soit θ : la figure 11 présente les valeurs de θ ainsi établies.

Radioactivité

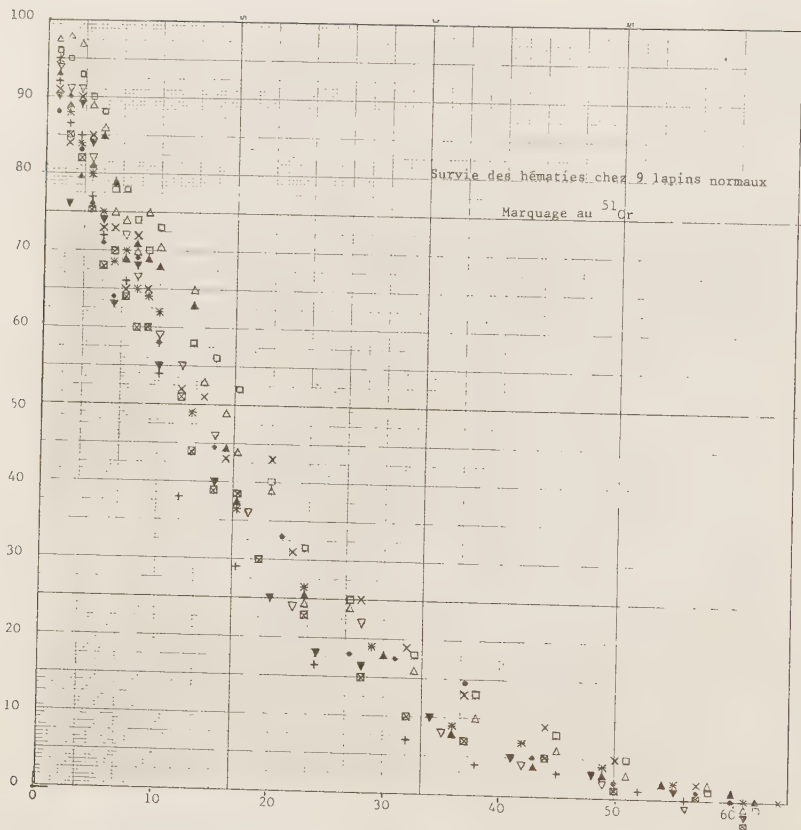


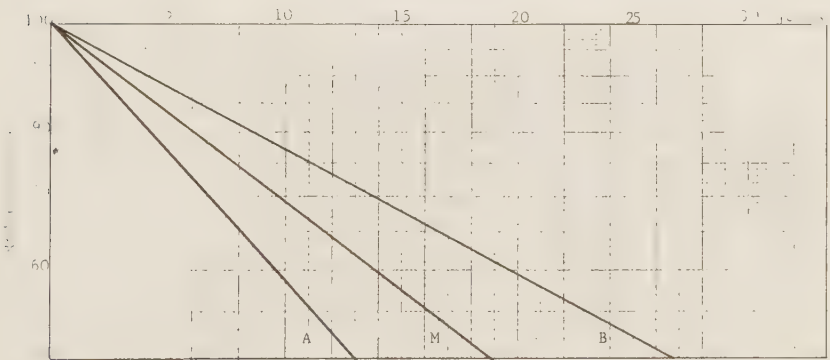
figure 10

Le pourcentage d'élution du ^{51}Cr par jour est donné par la formule $Y = 100 (1 - \sqrt[\theta]{0,5})$.

Cette élution est variable, mais elle est chez le lapin toujours supérieure à 1 %, chiffre obtenu chez l'homme. Pour les 10 lapins que nous avons utilisés, la moyenne est de 3,6 % par jour, avec des valeurs extrêmes allant de 2,6 à 5,2 %. Ces chiffres sont en accord avec ceux de Brading et coll. (148) qui, sur 8 animaux, ont calculé une moyenne d'élution de 3,2%.

Figure 11

Graphique des valeurs de θ (temps nécessaire à l'élution de la moitié du chrome fixé sur les hématies de lapin normal)



A et B = valeurs extrêmes

M = moyenne arithmétique.

Un coefficient aussi élevé peut suggérer que l'élution n'est pas le seul phénomène responsable du déficit en chrome. On peut penser avec Paoletti (146) et Benard et coll. (147) qu'il existe chez le lapin normal deux types de destruction érythrocytaire, une d'origine endogène due au vieillissement, l'autre d'origine exogène due à une élimination constante frappant les cellules au hasard.

Cette hypothèse pourrait également expliquer l'aspect des courbes de survie des hématies étudiées avec le DF ^{32}P .

b) Durée de vie des hématies après contact avec l'agglutinine de Phaseolus vulgaris.

- Contact avec la dose faible (1 ml à 100 DH 50 + 9 ml d'eau physiologique).

Les quantités de radioactivité présentes 10 mn après l'injection, corrigées par rapport à la radioactivité totale injectée et à l'hématocrite, ne s'écartent pas d'une manière significative des valeurs initiales obtenues pour les témoins : (tableau IV)

TABLEAU IV

Radioactivité en coups/mn/ml de sang total	
Lapins témoins	Lapins traités
11.460	12.925
12.580	12.710
12.160	12.015
12.070	
(Moyenne arithmétique)	

Par contre, la décroissance est plus forte chez les animaux ayant reçu des cellules sensibilisées, pendant les premières 24 h. Il est donc surprenant que les demi-vies apparentes atteignent cependant des valeurs normales pour les 3 lapins ; une remontée de la radioactivité vers les 2ème, 3ème et 4ème jours indique peut-être une remise en circulation de cellules retenues auparavant dans les capillaires d'organes comme la rate ou le foie.

La durée de vie maximum des hématies est également comparable à celle des témoins.

Les courbes de survie sont portées dans la fig. 12.

- Contact avec la dose forte (10 ml à 100 DH 50 par ml).

En comparant la radioactivité initiale des témoins et celle présente dans la circulation des lapins dont les cellules ont été agglutinées après 10 mn, il apparaît un déficit oscillant autour de 50 p. cent (Tabl. V).

TABLEAU V

Radioactivité en coups/mn/ml de sang total		Pourcentage de radioactivité présente après 10 mn par rapport à la moyenne des témoins
Lapins témoins	Lapins traités	
11.460	7.145	59,2 %
12.580	6.310	52,3 %
12.160	6.800	56,3 %
—	7.210	59,7 %
12.070	5.380	48,3 %
(moyenne arithmétique)		

Les courbes de survie sont portées dans la figure 13.

Pour tous les animaux ayant reçu des hématies traitées par l'agglutinine, une certaine proportion de cellules injectées est encore capable d'atteindre une durée de vie normale.

Radioactivité

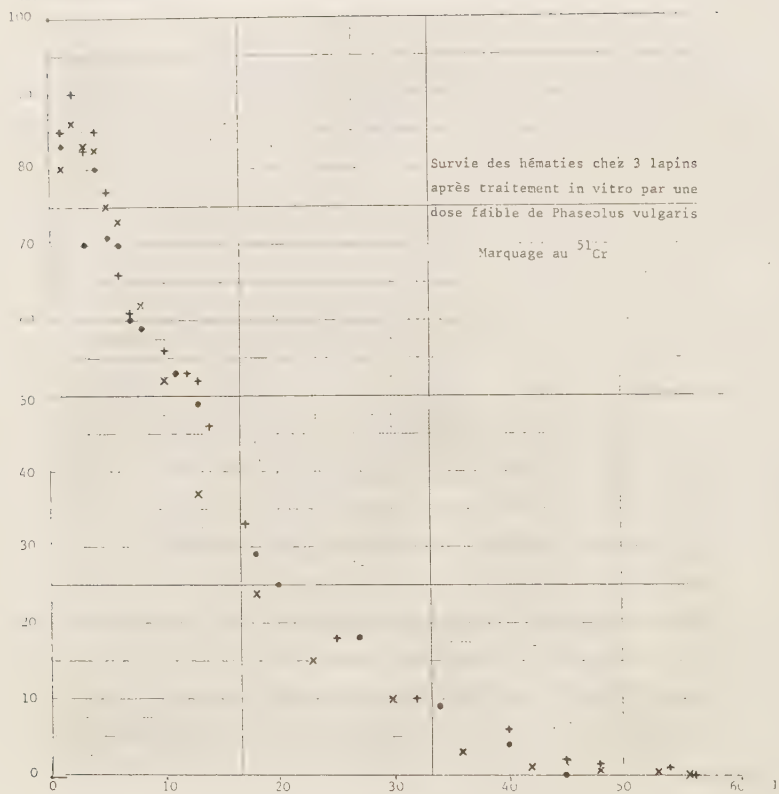
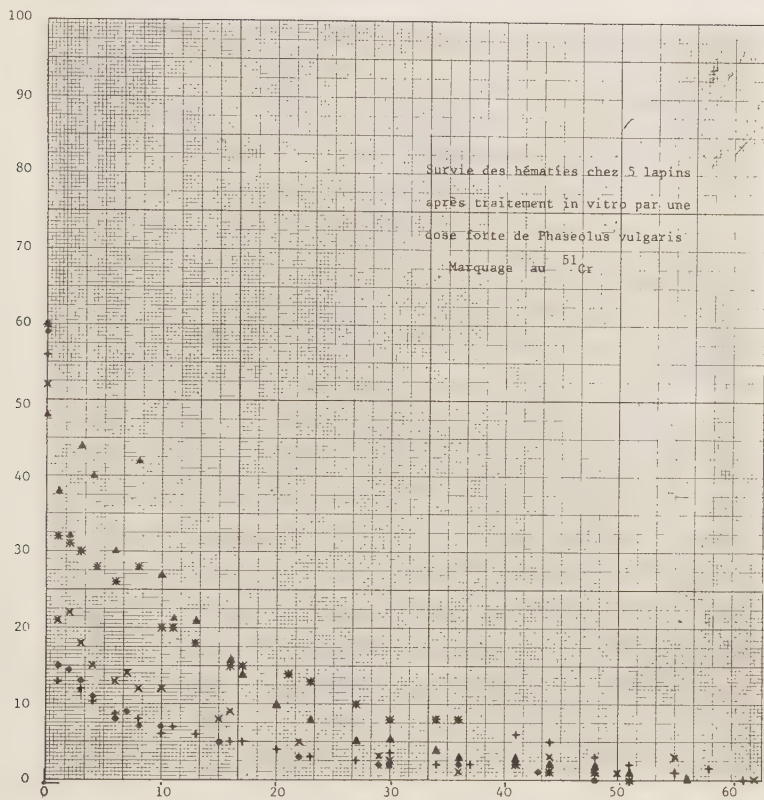


figure 12

Radioactivité



c) *Durée de vie des hématies après contact avec l'agglutinine de Lactarius controversus :*

- Contact avec la dose faible (1 ml à 100 DH 50 + 9 ml de solution saline).

Les quantités de radioactivité présentes 10 mn après l'injection, corrigées par rapport à la radioactivité totale injectée et à l'hématocrite, ne s'écartent pas d'une manière significative des valeurs initiales obtenues pour les témoins (tableau VI).

TABLEAU VI

Radioactivité en coups/mn/ml de sang total	
Lapins témoins	Lapins traités
21.575	21.530
22.655	22.180
20.590	25.480
—	17.510
21.605	
(moyenne arithmétique)	

Les courbes de survie sont portées dans la figure 14.

- Contact avec la dose forte (10 ml à 100 DH 50 par ml)

La comparaison avec 4 témoins fait apparaître, après 10 mn un déficit en radioactivité, compris entre 10 et 21 % : (tableau VII)

TABLEAU VII

Radioactivité en coups/mn/ml de sang total		Pourcentage de radioactivité présente après 10 mn par rapport à la moyenne des témoins
Lapins témoins	Lapins traités	
7.125	6.490	89,8 %
7.650	6.200	85,9 %
6.865	6.410	88,8 %
7.240	5.720	79,2 %
—	6.350	87,9 %
7.220	5.920	82 %
(moyenne arith- métique)		

Ce déficit est significatif sur la base du test d'homogénéité établi sur les moyennes des 2 séries d'expériences.

Les cellules retirées de la circulation le sont très rapidement généralement dans les premières 24 heures. Les hématies présentes au 2ème jour possèdent une survie sensiblement normale, comme il est possible de le vérifier en prenant comme valeur initiale la radioactivité des échantillons prélevés le 3ème jour après l'injection.

La demi-vie apparente considérablement raccourcie, se situe entre 5 et 8 jours en moyenne.

Les courbes de survie sont portées sur la figure 15.

d) Durée de vie des hématies après contact avec l'agglutinine de Boletus subtomentosus :

- Contact avec la dose faible (1 ml d'extrait agglutinant au 1/50e + 9 ml de solution saline)

On n'observe pas d'écarts significatifs entre les quantités de

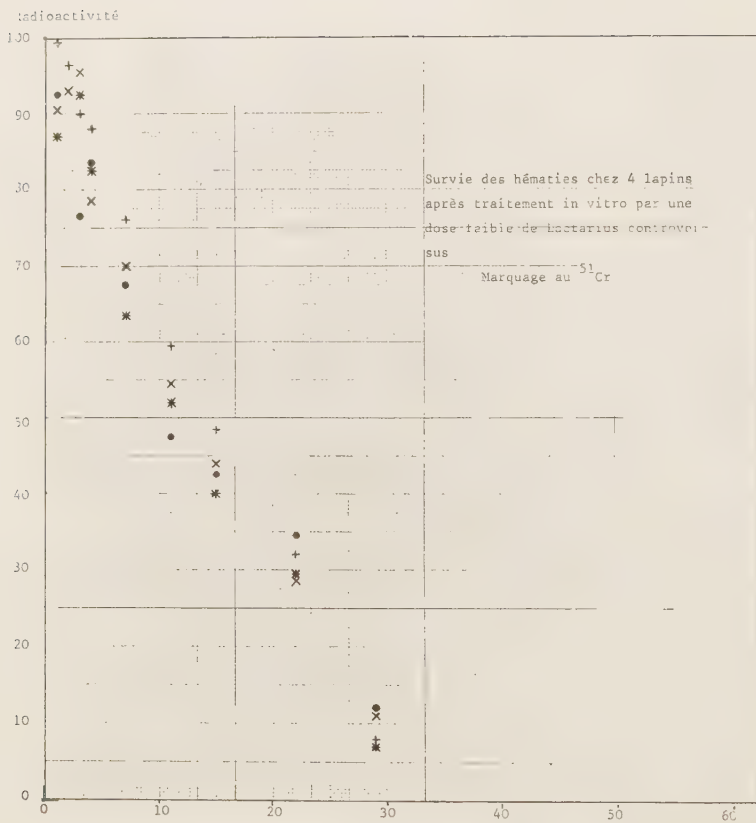


figure 14

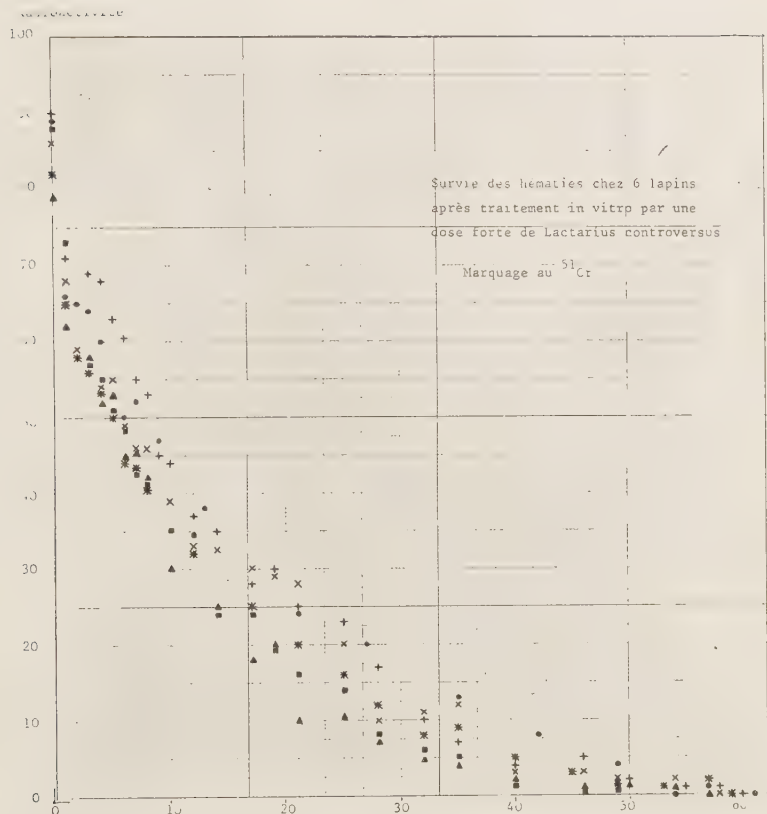


figure 15

radioactivité présentes 10 mn après l'injection et les valeurs initiales obtenues pour les témoins (tableau VIII).

TABLEAU VIII

Radioactivité en coups/mn/ml de sang total	
Lapins témoins	Lapins traités
21.575	18.730
22.655	24.790
20.590	25.960
—	26.910
21.605	24.085
(moyenne arithmétique)	

Les courbes de survie sont portées dans la figure 16

- Contact avec la dose forte (10 ml d'extrait agglutinant au 1/50e)

Après 10 mn, l'écart avec la moyenne de 3 témoins se place entre 50 et 60 % (tableau IX).

Les premières 24 heures, il y a une phase de destruction cellulaire rapide. Un certain pourcentage d'hématies se montre capable d'atteindre une durée de vie comparable à celle des témoins.

Les courbes de survie sont portées dans la figure 17.

TABLEAU IX

Radioactivité en coups/mn/ml de sang total		Pourcentage de radioactivité présente après 10 mn par rapport à la moyenne des témoins
Lapins témoins	Lapins traités	
9.230	5.600	62,3 %
8.070	4.360	48,5 %
9.670	5.440	60,5 %
—	4.580	50,9 %
8.990		
(moyenne arithmétique)		

e) Etude de survie après 3 jours :

Nous avons utilisé les valeurs expérimentales des expériences qui précèdent pour étudier comparativement la survie des globules existant dans la circulation au-delà du 3ème jour suivant le marquage et la réinjection. Les courbes suivantes (fig. 18, 19, 20) juxtaposent successivement la survie des hématies normales à celle des hématies après traitement par les 3 hémagglutinines, le jour 3 des courbes précédentes étant pris comme jour 0.

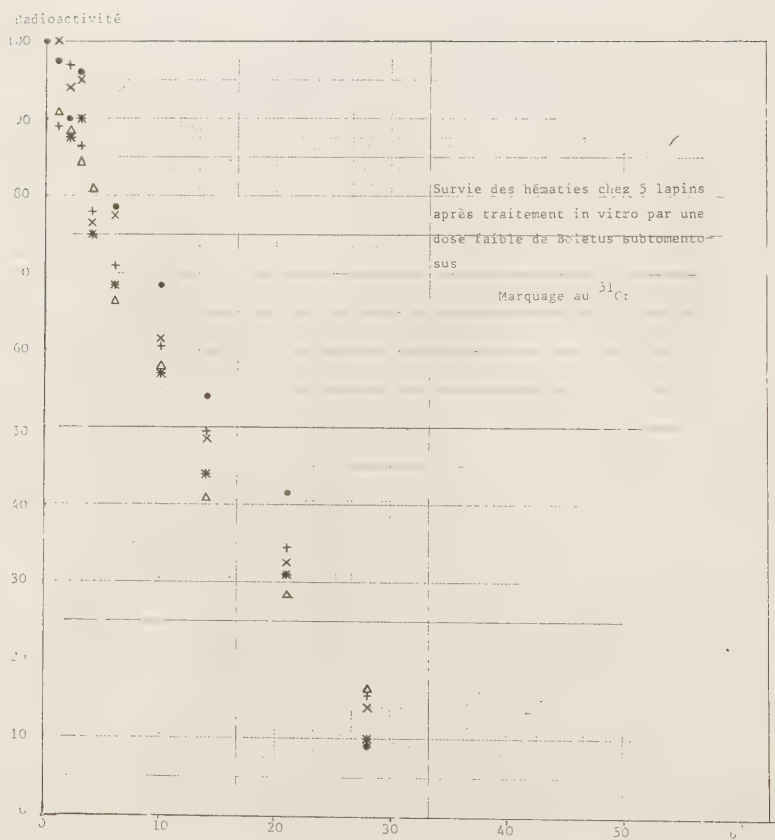


figure 16

Radioactivité

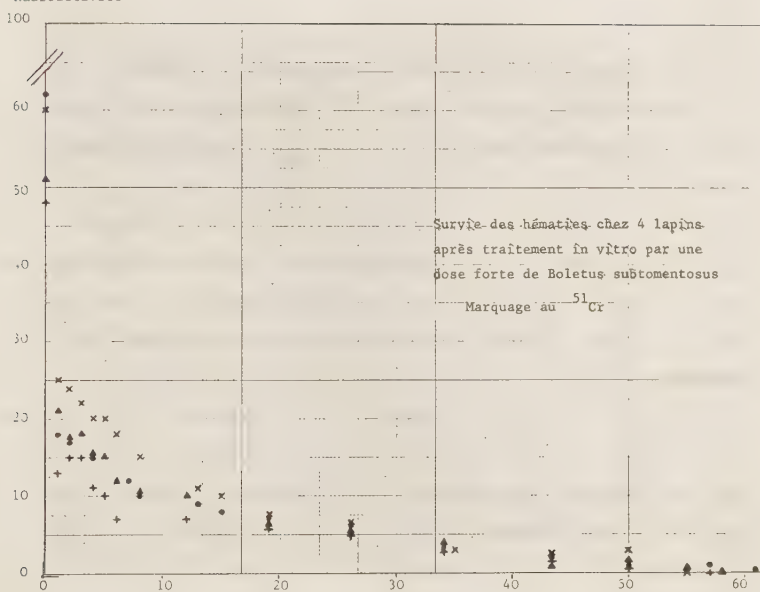


figure 17

Radioactivité

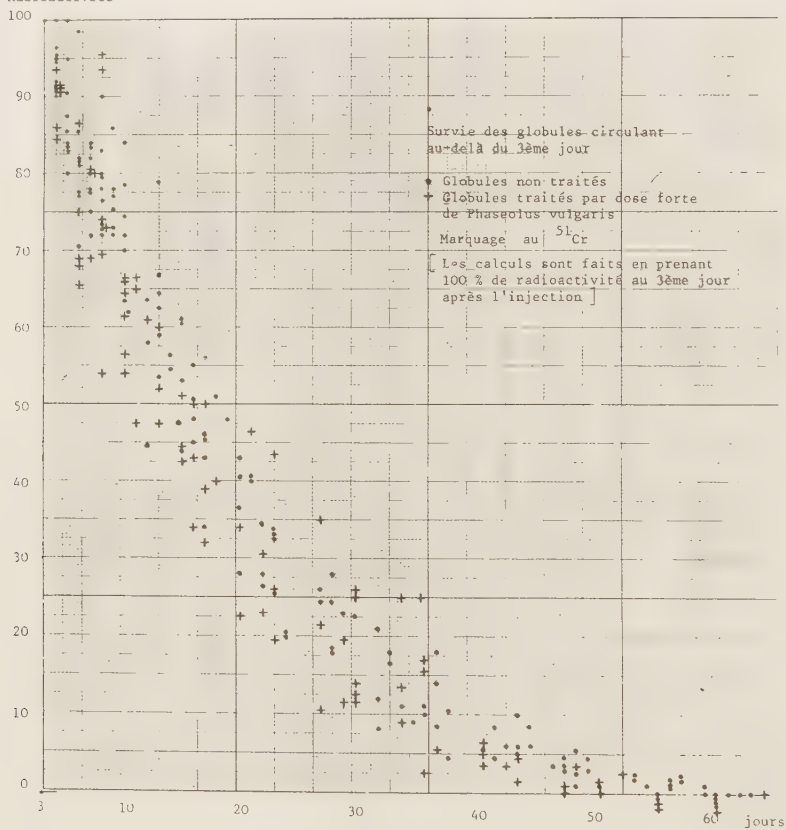


figure 18

Radioactivité

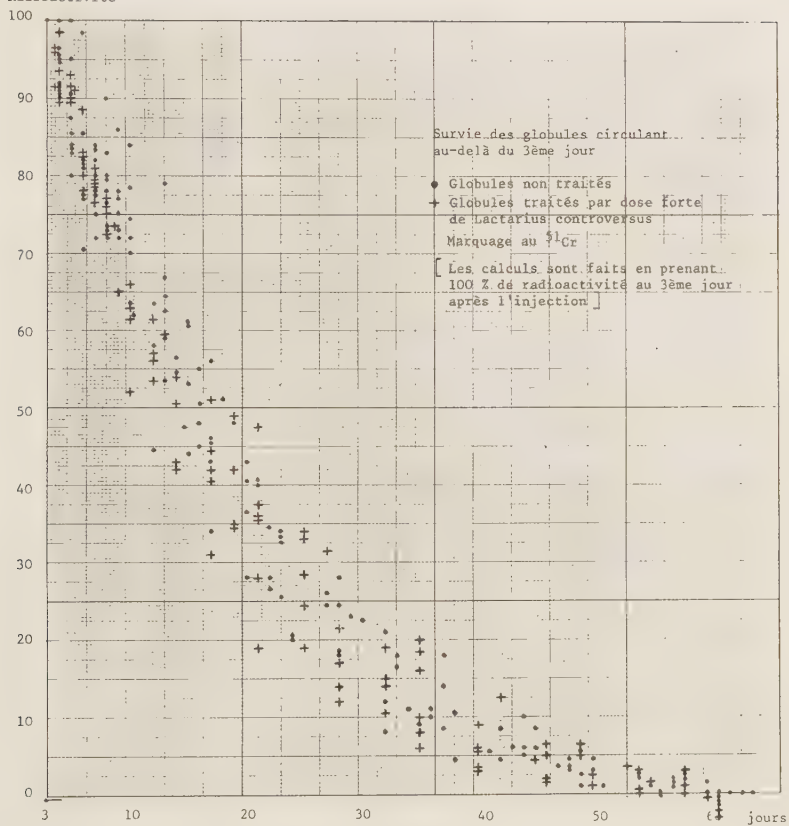


figure 19

Radioactivité

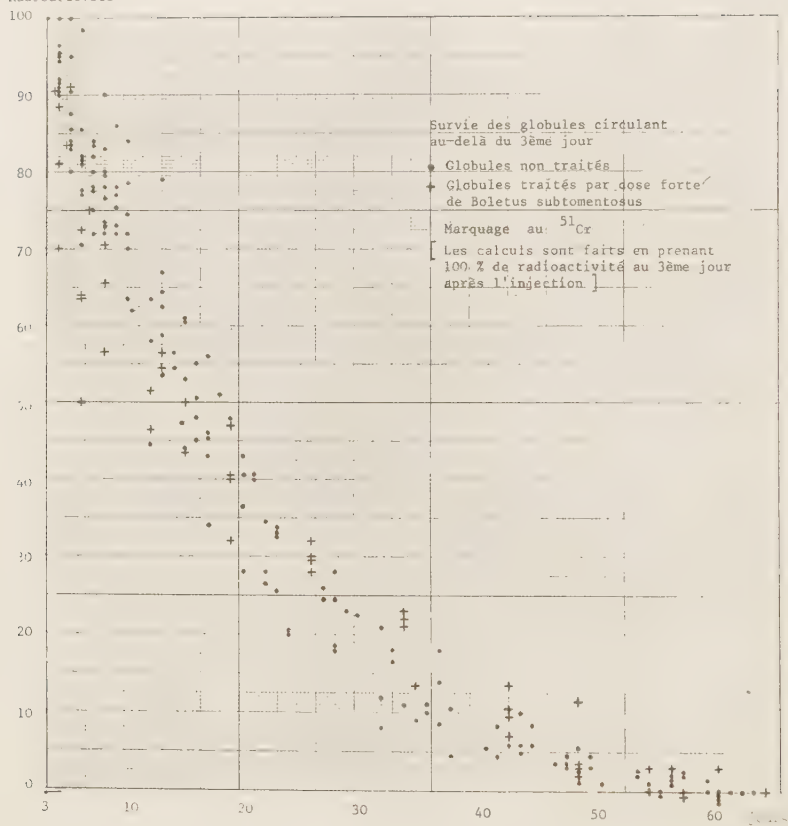


figure 20

f) Scintigraphie et comptage des viscères après action d'une dose forte de Boletus subtomentosus :

La scintigraphie pratiquée sur l'animal vivant montre nettement une localisation de l'activité dans la région sous-diaphragmatique. Malgré les repères costaux, il est impossible de définir sur les clichés les organes responsables. C'est pourquoi un comptage direct des organes a été fait après sacrifice et dissection de l'animal, dont rend compte le tableau X. Un comptage identique a été fait comparativement sur un lapin non traité, sacrifié 3 heures après réinjection de ses propres hématies simplement marqué au ^{51}Cr .

TABLEAU X

Radioactivité des viscères de lapin après injection d'hématies de lapin marquées, avec et sans traitement par *Boletus subtomentosus*.

Nature	Lapin traité		Lapin normal	
	Poids total en g.	Activité en nbre de coups	Poids total en g. (à titre indicatif)	Activité en nbre de coups
coeur (lavé)	7,9	35	7,5	200
foie	135	220	173,5	300
poumons	13,5	335	13,9	820
rate	1,4	3310	2,6	1050
reins	10,9 + 10,7	220	13,3 + 12,4	400
sang du coeur		410		5200

2 - Marquage des hématies par le DF³²P et sensibilisation in vivo.

a) Durée de vie des hématies normales :

En coordonnées arithmétiques le rapport des valeurs expérimentales permet de constater que la diminution de la radioactivité est plus importante pendant la période qui suit l'injection du marqueur que par la suite.

Cette composante rapide de la courbe se manifeste pendant 3 à 4 jours, et correspond sans doute à une élution du DF³²P comparable à celle généralement observée chez l'homme (158, 161) ou les animaux par divers expérimentateurs (142, 143).

L'amplitude de cette élution est d'ailleurs différente d'un lapin à l'autre ; si l'on fixe à 5 jours la durée maximum du phénomène (162) la quantité de radioactivité présente au niveau des hématies exprimée en pourcentage de celle présente au jour 0 est comprise entre 62 et 78 % ; de même, au lendemain de l'injection, ce pourcentage s'échelonne entre 74 et 87 %.

Au-delà du 5ème jour, nous nous attendions à ce que la décroissance de la radioactivité devienne une fonction linéaire du temps ; or il n'en est rien, et les valeurs expérimentales sont constamment en dessous de la droite de régression supposée.

En ce qui concerne la durée de vie maximum des hématies, la méthode au DF³²P fournit des chiffres un peu plus élevés que le marquage au chrome puisque l'annulation de la radioactivité survient entre 62 et 70 jours (moyenne 65 jours). Les courbes de survie sont portées dans la figure 21.

Afin d'analyser plus en détail les caractéristiques du phénomène entre le 5ème et le 65ème jour, nous avons traité les résultats de la façon suivante : la première portion de la courbe qui correspond à la phase d'élution a été écartée en choisissant comme valeur initiale 100 la quantité de radioactivité présente au 5ème jour.

Puis, la composante linéaire de la fonction relative à la sénescence des globules rouges en dehors de tous phénomènes d'élution ou de destruction non liée au vieillissement, est soustraite en multipliant chaque valeur trouvée aux différentes périodes de prélèvements par la quantité $\frac{60}{60-t}$.

Les valeurs ainsi calculées et portées sur un graphique en coordonnées semi-logarithmiques, ainsi qu'on peut le voir sur les fig. 23 à 26, laissent apparaître, plus ou moins nettement d'ailleurs, plusieurs stades dans le processus de disparition de la radioactivité circulante. Ce n'est donc pas un phénomène exponentiel simple qui préside au retrait.

Du 5ème au 20ème jour suivant l'injection, la pente de la courbe est relativement forte ; elle s'atténue du 20ème au 35ème jour, pour s'accroître à nouveau après ce délai.

Les pentes des lignes de régression calculées par la méthode des moindres carrés pour des intervalles de temps allant du 5ème au 20ème jour suivant l'injection, montrent des différences très sensibles d'un lapin à l'autre, les valeurs étant comprises entre - 0,007 et - 0,014.

Si l'on utilise toutes les valeurs de radioactivité obtenues entre le 5ème et le 51ème jour suivant l'injection sans tenir compte des points d'inflexion, les droites de régression ainsi obtenues possèdent également des pentes variant dans des proportions importantes, puisque les valeurs extrêmes obtenues sont - 0,0058 et - 0,012.

Toutes les valeurs des pentes sont portées dans le tableau ci-après : (tableau XI).

TABLEAU XI

Pentes des droites (coordonnées semi-logarithmiques) représentatives de la diminution de radioactivité des hématies en fonction du temps.

Lapins témoins			Lapins traités		
Repère	Pente 5e → 20e j.	Pente 5e → 51e j.	Repère	Pente 5e → 20e j.	Pente 5e → 51e j.
▽	- 0,007	- 0,0093	●	- 0,0050	- 0,0052
+	- 0,011	- 0,0058	+	- 0,0054	- 0,0090
□	- 0,011	- 0,0083	*	- 0,010	- 0,011
▼	- 0,012	- 0,0083	△	- 0,011	- 0,0094
△	- 0,012	- 0,011	▽	- 0,011	- 0,010
x	- 0,013	- 0,0075	x	- 0,012	- 0,0054
▲	- 0,014	- 0,0073	▲	- 0,013	- 0,0085
●	- 0,014	- 0,0099	▼	- 0,013	- 0,011
○	- 0,014	- 0,012			
*	- 0,014	- 0,012			
	- 0,012	- 0,0091		- 0,010	- 0,0087
	(moyenne arithmétique)			(moyenne arithmétique)	

b) Durée de vie des hématies après injection de l'agglutinine de Lactarius controversus.

Sur un lot de 10 lapins, un animal a présenté un état de choc immédiatement après l'injection, un autre est mort 5 jours après. Des contrôles hématologiques effectués régulièrement pendant 30 jours sur les autres n'ont montré aucune altération de l'héмограмme.

Les résultats expérimentaux ont été traités de la même manière que ceux livrés par les témoins.

Les courbes de survie sont portées dans la figure 22.

Les droites de régression figurent dans les graphiques 27 et 28.

Les valeurs des pentes des droites de régression, calculées par la méthode des moindres carrés pour des intervalles de temps allant du 5ème au 20ème jour et du 5ème au 51ème jour suivant l'injection du marqueur, sont portées dans le tableau XI comparativement aux valeurs témoins.

3 - Influence du sérum de lapin sur l'agglutination.

Aux deux températures d'incubation, 20 et 37° C, les hémagglutinines de *Lactarius controversus* et *Phaseolus vulgaris*, ainsi que l'extrait de *Boletus subtomentosus*, agglutinent toutes les trois les hématies de lapin à 1/1028, la lecture étant macroscopique.

La substitution du sérum de lapin à la solution saline, comme liquide de dilution, entraîne l'annulation de tout effet agglutinant dans les 3 séries de tubes, c'est-à-dire pour les 3 agglutinines.

L'addition de ce même sérum après le temps nécessaire à l'apparition et à la lecture des agglutinats, ne provoque au contraire aucune modification du titre lisible, après 2 h. et 24 h. de séjour à 37° C.

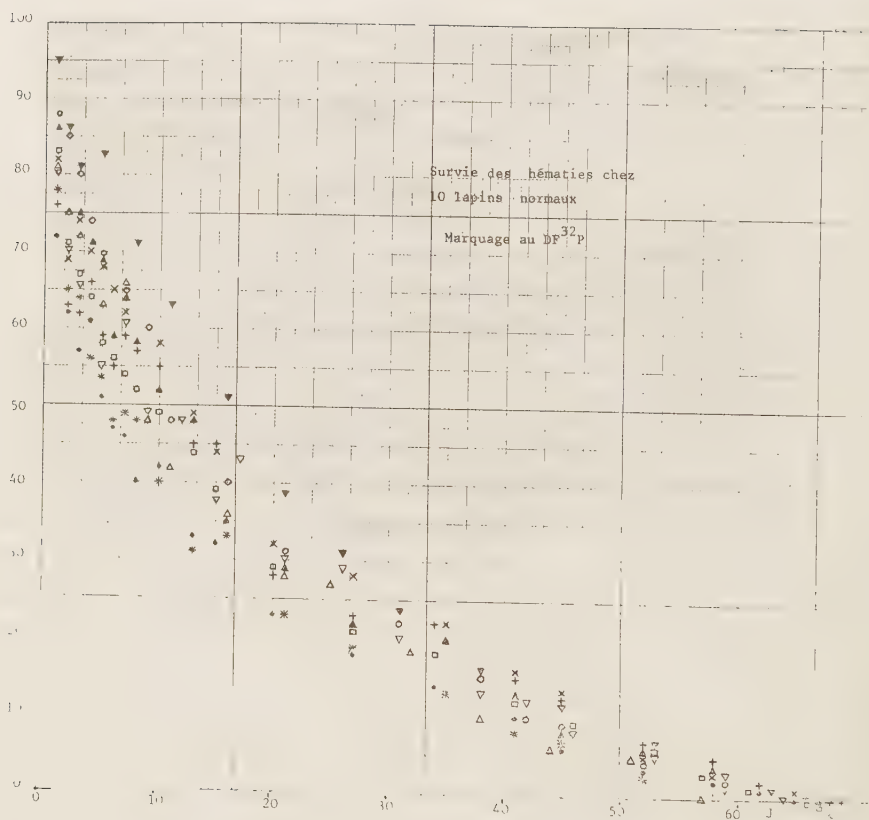


figure 21

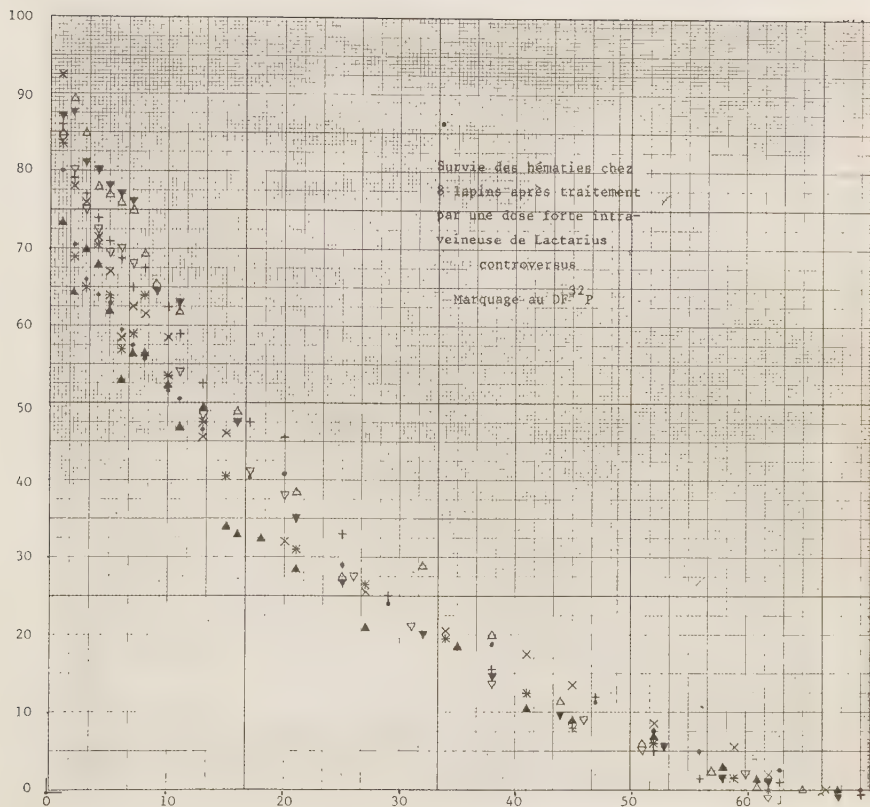


figure 22

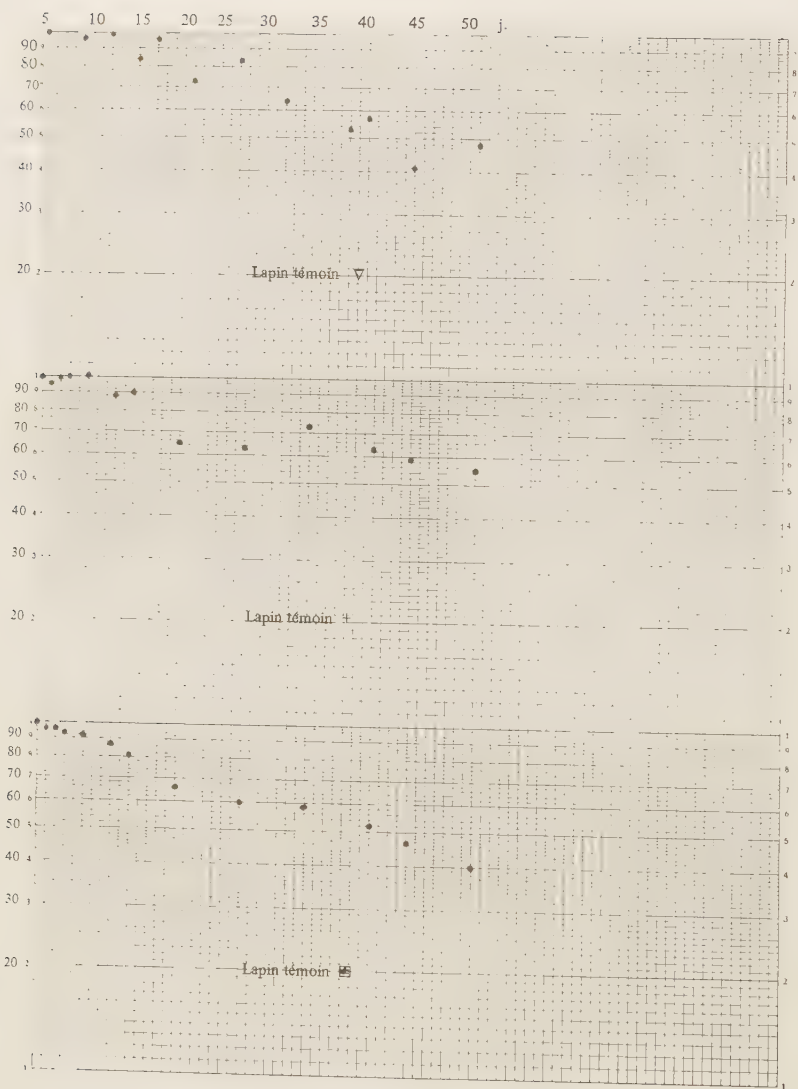


Figure 23

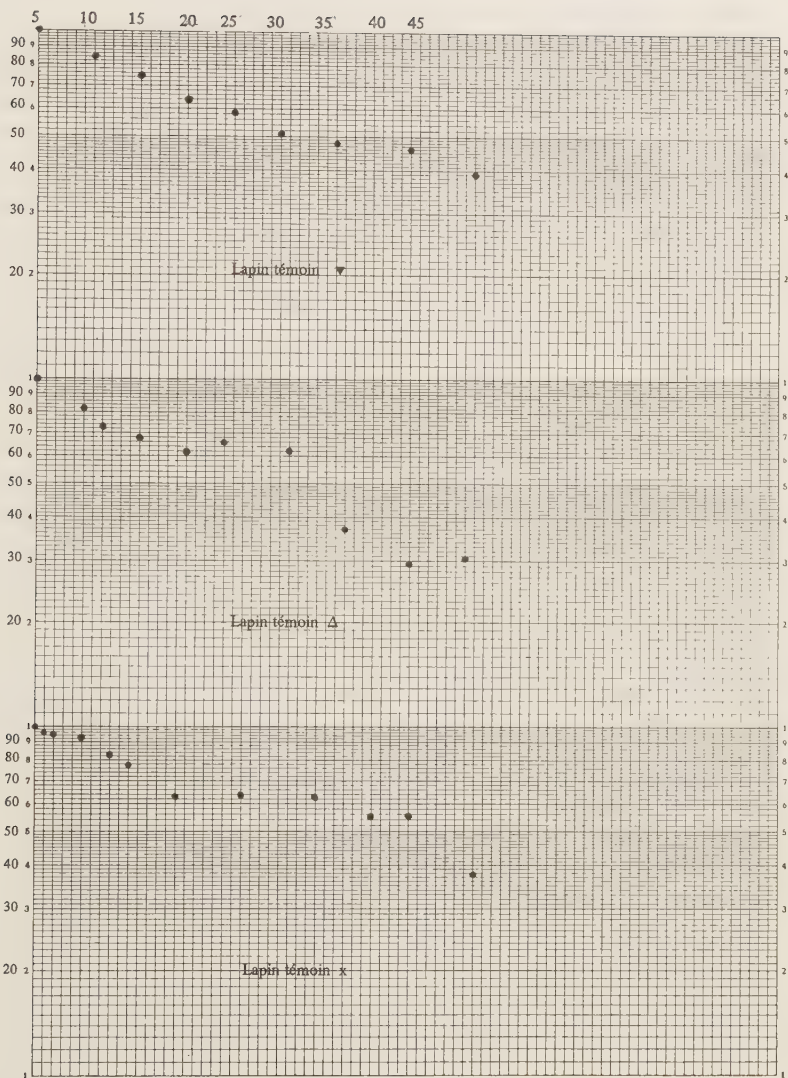


Figure 24



Figure 25

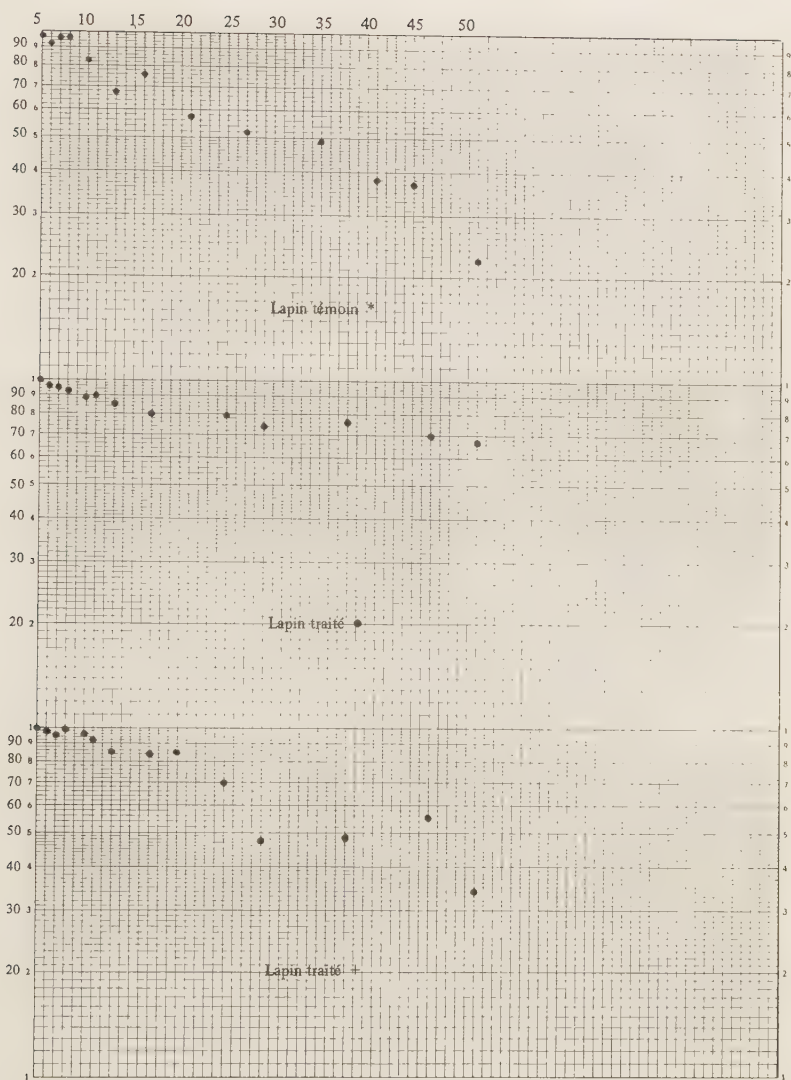


Figure 26

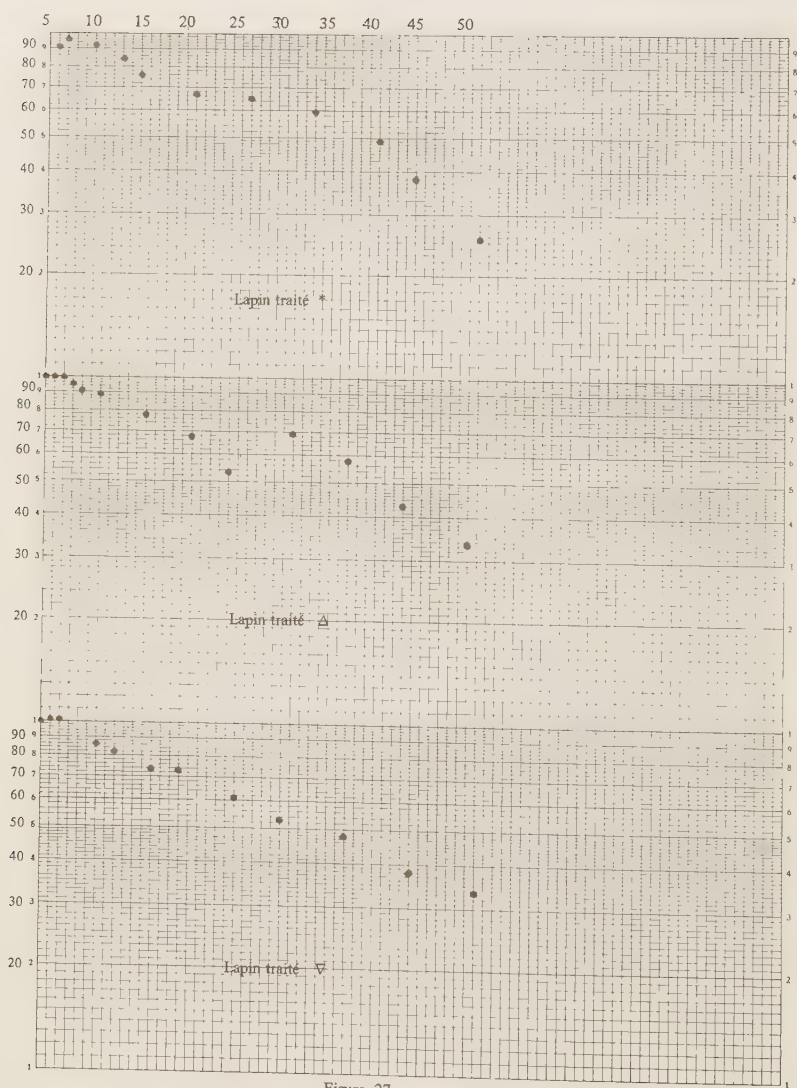


Figure 27

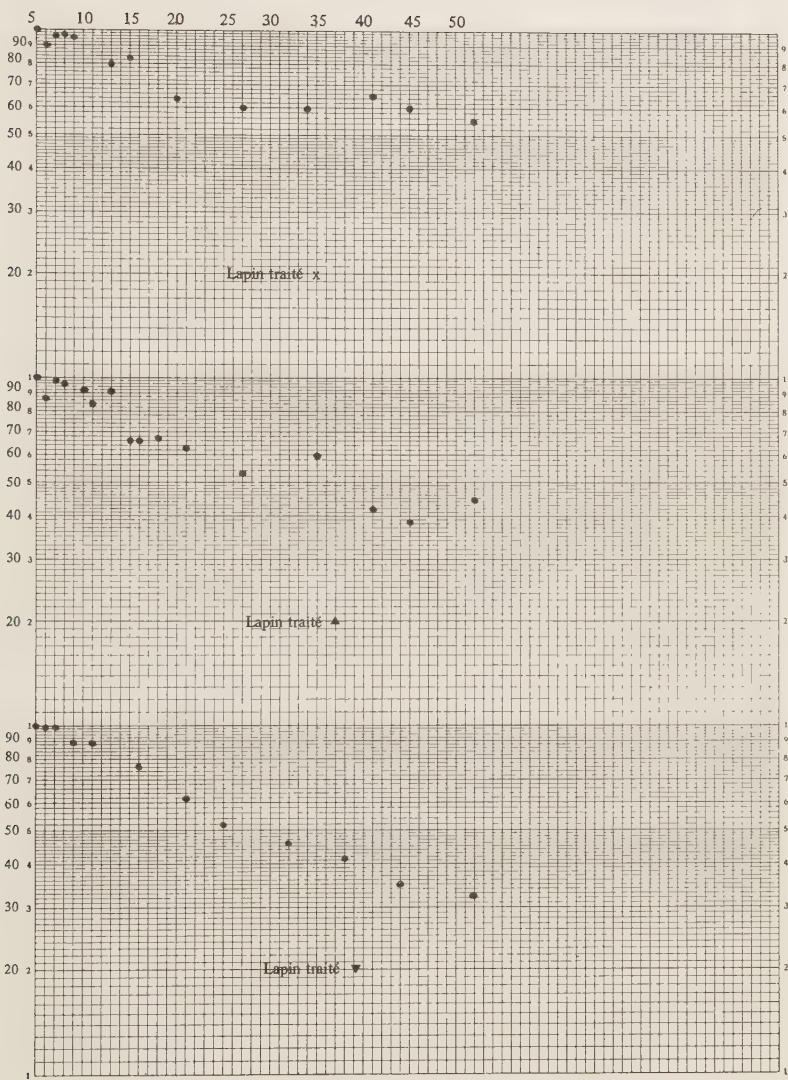


Figure 28

4°) DISCUSSION.

Avant d'aborder les conclusions qu'on peut tenter de dégager des études de survie dont les résultats viennent d'être exposés, il est nécessaire de rappeler que les quantités des diverses agglutinines employées ont été déterminées, pour *Phaseolus vulgaris* et *Lactarius controversus*, par la méthode de Wilkie et Becker en présence d'hématies humaines A1 car la fragilité des hématies de lapin interdisait leur emploi pour un tel dosage. L'irréversibilité de l'action de *Boletus subtomentosus*, dans les conditions où nous l'avons mise en oeuvre, s'opposait de même au choix de cette technique, quels que soient les globules tests. Il est donc opportun de noter que l'équivalence de doses entre les agglutinines de *Phaseolus* et de *Lactarius* n'a sa vraie valeur qu'au regard des hématies humaines A1, et que en plus de cette réserve, l'agglutinine de *Boletus* n'a été ajustée qu'approximativement, par la méthode des dilutions en tubes.

Nous examinerons d'abord des données fournies par l'étude des hématies traitées par les agglutinines in vitro.

Doses faibles d'agglutinine de Phaseolus vulgaris - L'examen des courbes montre qu'il n'y a pas de retrait immédiat d'hématies traitées puisque la radioactivité mesurée 10 mn après l'injection est comparable à celle des témoins. L'absence d'agglutinats macroscopiquement perceptibles dans la suspension injectée peut expliquer cette observation. Mais on assiste, dans les 24 premières heures qui suivent, à une chute de la radioactivité témoignant de la disparition d'une partie des hématies marquées : nous en concluons à une séquestration de ces cellules (dans la rate, le foie, ou les poumons). Cette soustraction d'éléments au courant sanguin n'est que temporaire puisque la radioactivité remonte après 48 ou 72 h., témoignant d'une libération secondaire des hématies séquestrées.

Doses fortes d'agglutinine de Phaseolus vulgaris - Rappelons que la dose employée est telle que toute la suspension d'hématies marquées soumise à son action est assemblée en agglutinats volumineux, baignant dans un liquide limpide exempt d'hématies libres. On s'attendrait à un arrêt immédiat de la totalité des hématies dès leurs premiers passages dans les capillaires spléniques, pulmonaires ou hépatiques : de fait, on assiste à

une diminution importante et brusque de la radioactivité, mais le phénomène se poursuit jusqu'au 2ème jour environ. Il semble donc que malgré l'importance de l'agglutination, des agrégats globulaires ou des hématies fragilisées demeurent libres encore plusieurs heures. Une fois achevé ce retrait massif, un pourcentage faible de cellules marquées continue à circuler et survit normalement : nous les considérons comme des cellules dont l'agglutinine s'est éluee car l'excès d'agglutinine et les conditions d'agglutination laissent peu de chances à l'éventualité d'hématies qui auraient échappé à l'agglutinine.

Doses faibles d'agglutinine de Lactarius controversus - Les mesures de radioactivité après 10 mn indiquent ici, comme dans le cas précédent qu'il n'y a pas de retrait immédiat des hématies traitées, après leur réinjection. Les courbes de disparition sont tout à fait comparables à celle des témoins, et on n'observe pas d'ascension secondaire de la radioactivité qui témoignerait, comme dans le cas du *Phaseolus*, d'une libération d'hématies temporairement séquestrées.

Doses fortes d'agglutinine de Lactarius controversus - On assiste ici à un retrait d'hématies immédiat mais très modéré, mais, même atténué par rapport à ce qui a été observé avec *Phaseolus*, ce phénomène se poursuit 24 heures.

Doses faibles d'agglutinine de Boletus subtomentosus - Les conclusions qu'on peut tirer des résultats sont tout à fait superposables à celles proposées pour *Lactarius controversus* (dose faible).

Doses fortes d'agglutinine de Boletus subtomentosus - Les résultats, après 10 mn et l'allure des courbes de disparition sont très comparables à ceux obtenus avec les doses fortes de *Phaseolus vulgaris* : le retrait des hématies agglutinées n'est pas total malgré la dose employée, ni immédiat puisque les courbes ne suivent une allure régulière qu'après 24 heures.

De ces constatations, il est possible de tirer une première conclusion : à doses hémagglutinantes équivalentes, des hémagglutinines différentes provoquent des retraits immédiats d'hématies d'importance

variable, forts pour *Phaseolus vulgaris* et *Boletus subtomentosus*, faible pour *Lactarius controversus*. C'est la preuve que, malgré leur manque commun de spécificité, ces agglutinines peuvent avoir un comportement distinct à l'égard de globules identiques.

Il faut ensuite remarquer que pour toutes les agglutinines essayées à dose forte, ce retrait immédiat se prolonge 24 à 48 heures, pour être suivi d'une élimination très progressive des hématies restantes. Si on étudie la survie des globules seulement au-delà du 3ème jour, on constate comme les courbes le montrent à l'évidence, que rien ne différencie les hématies traitées des hématies normales. Ainsi, les doses massives ne modifient en rien la survie des hématies qui ont échappé au retrait initial. Il ne peut s'agir que d'hématies dont l'agglutinine s'est éluee - mais nous avons vu que l'agglutinine de *Boletus subtomentosus* n'est pas éluable, au moins in vitro - ou qui se sont libérées des agglutinats primitifs. On doit voir là une preuve que les agglutinines mises en jeu ne provoquent pas, au niveau des globules, de lésions incompatibles avec une survie normale.

Pour les hématies retirées de la circulation, l'étude de l'activité des organes après sacrifice d'un lapin normal et d'un lapin traité par *Boletus subtomentosus* précise leur localisation :

On peut, chez le lapin témoin, en rapportant les activités de chaque organe à celle du sang, estimer leur teneur approximative en sang. On obtient les rapports suivants :

Coeur	3,8
Foie	5,8
Poumons	15,8
Rate	20,2
Reins	7,7

En appliquant ces coefficients aux organes respectifs du lapin traité, compte tenu de l'activité propre de son sang cardiaque, on calcule la part revenant au sang résiduel de chaque organe, qui intervient, dans les mesures effectuées, à côté de l'activité due à la rétention des agglutinats :

Coeur	7,9	x 3,8	x 410	=	12.308
Foie	135	x 5,8	x 410	=	321.030
Poumons	13,5	x 15,8	x 410	=	87.453
Rate	1,4	x 20,2	x 410	=	11.595
Reins	21,6	x 7,7	x 410	=	68.191

Pour connaître l'activité revenant dans chaque organe aux seuls agglutinats, il suffit de défalquer ces valeurs de l'activité totale de chaque organe, produit de son activité par son poids, c'est-à-dire son rendement. Le calcul donne les résultats suivants .

TABLEAU XII

Radioactivité des viscères de lapin après injection d'hématies marquées, traitées par *Boletus subtomentosus*.

- Correction du sang résiduel -

	Activité totale	Activité due au sang	Activité propre ou efficacité	Activité par unité poids ou rendement
Coeur	27.650	12.310	15.340	1.940
Foie	2.970.000	321.030	2.648.970	19.620
Poumons	452.250	87.450	364.800	23.080
Rate	463.400	11.595	451.805	322.710
Reins	475.200	68.190	407.010	18.840

On constate l'importance du foie qui retient une masse très supérieure à celles retenues par les autres organes étudiés. Rate, reins et poumons, avec des efficacités très inégales, ont finalement à peu près le même rôle, en raison de leurs tailles respectives, bien que les poumons soient du fait de l'injection intraveineuse du sang traité, l'organe que les agglutinats atteignent en priorité.

Les observations qui précèdent conduisent à attribuer, dans la disparition d'un certain nombre de globules de la circulation sous l'influence des agglutinines, le rôle principal au facteur mécanique et à admettre que les hémagglutinines végétales utilisées n'altèrent pas les hématies sur lesquelles elles se fixent. Or l'action de certaines phytagglutinines sur les γ globulines sériques permet de ne pas écarter l'hypothèse d'une influence au moins indirecte, par un mécanisme simulant la combinaison antigène-anticorps : d'une part la concanavaleine A peut réagir avec les γ globulines en les précipitant, selon Leon (163), d'autre part d'après Sjöquist et Stahlenheim (164), une protéine staphylococcique, la protéine A, se complexe aux immunoglobulines γ qui acquièrent de ce fait, l'aptitude à fixer le complément. On peut donc envisager que des agglutinines différentes de la concanavaleine soient, en s'unissant comme elle à des globulines, capables de les rendre fixatrices. Si tel est le cas, et si ces agglutinines conservent leur site de combinaison avec les hématies, une altération globulaire devient concevable.

Nous avons recherché à vérifier la première partie de cette hypothèse, et les résultats négatifs obtenus nous ont dispensé d'aborder la deuxième. Cette recherche d'une action sur le complément a été faite avec les 3 phytagglutinines, en employant la technique sérologique classique de Kolmer (165). Dans cette technique de fixation du complément, il a suffi de substituer à l'antigène et à l'anticorps des volumes équivalents de solution d'agglutinine. L'expérience a été conduite avec 4 doses différentes pour chaque agglutinine, que l'on a mises en contact pendant 16 h à $+4^{\circ}$ C avec 2 unités de complément sous un volume égal. L'addition ultérieure de globules sensibilisés a permis de déterminer l'activité du complément d'après le taux d'hémolyse obtenu. Dans ces conditions, seule l'agglutinine de *Phaseolus vulgaris*, à sa concentration la plus forte, a entraîné une diminution de l'hémolyse mesurée. Mais cette dose est aussi la seule, dans la série d'expériences, qui ait provoqué une agglutination visible des hématies sensibilisées. Ainsi, dans les conditions opératoires, c'est-à-dire avec une dose relativement modérée de complément, les agglutinines n'altèrent pas son activité.

Les essais in vivo, menés avec la seule agglutinine de *Lactarius controversus* puisqu'elle seule se prêtait à une purification indispensable,

montrent, contrairement aux précédents, une sorte d'indifférence des hématies à l'introduction de l'agglutinine dans la circulation.

L'examen du tableau XI fait apparaître que l'administration d'une dose considérable d'agglutinine de *Lactarius controversus* par voie intra-veineuse ne modifie en rien les pentes calculées par rapport à celles du lot témoin.

Pourtant, une quantité aussi considérable d'hémagglutinine est en mesure d'agglutiner in vitro la totalité des hématies circulantes séparées de leur plasma.

Quels sont les facteurs susceptibles d'expliquer une neutralisation aussi totale et aussi rapide des propriétés de l'extrait végétal vis-à-vis des hématies ?

C'est le sérum qu'il faut incriminer, après les observations de quelques expérimentateurs pour différentes lectines, dont *Phaseolus vulgaris* (109, 110), *Vicia leganyana* (166), *Sambucus nigra* (167).

Zaremba (167), et Godzinska et Schlesinger (168) ont montré que la fraction protéique du sérum n'était pas en cause, en l'éliminant par chauffage. Northrop et Liener (107, 108) émettent l'hypothèse d'une intervention de molécules type acide sialique ; ils ont, en effet, observé que le Receptor Destroying Enzyme (RDE) issu de *Clostridium perfringens* et capable de libérer de l'acide sialique à partir de récepteurs érythrocytaires, rendait les cellules inagglutinables par la P.H.A. du *Phaseolus*, comme il les rend inagglutinables par le virus de l'influenza (169).

Cependant, certaines agglutinines végétales échappent à cette règle : Voak et coll. (170) ont récemment constaté que les protéines sériques humaines augmentent l'activité anti-H de la lectine d'*Ulex europaeus* ; cet effet serait lié à la révélation d'agglutinines « incomplètes », par le milieu macromoléculaire.

Dans le cas des agglutinines de *Lactarius controversus* et *Boletus subtomentosus*, l'influence du sérum de lapin in vitro est manifeste : mis en présence des agglutinines avant leur contact avec les hématies il supprime tout effet hémagglutinant ultérieur. Ainsi s'explique l'absence de la moindre anomalie dans la survie des globules après injection directe de l'agglutinine dans les veines de l'animal.

On pourrait être tenté d'émettre l'hypothèse que la même inhibition s'est manifestée chez les lapins ayant reçu des hématies traitées in vitro et supposer que les agglutinats injectés à l'animal se dissocient en milieu plasmatique : le seul fait que les courbes de survie soient perturbées montre que si ce phénomène se produit, il doit être limité, et nos essais en tubes confirment que l'addition de plasma aux hématies déjà agglutinées ne modifie que très peu l'intensité de l'agglutination.

On comprend ainsi l'apparente insensibilité des hématies vis-à-vis des agglutinines végétales, lorsque celles-ci sont employées in vivo et la disparité des résultats concernant la survie érythrocytaire entre les expériences où le contact a lieu directement dans le torrent circulatoire et celles où les cellules sont séparées de leur plasma.

INFLUENCE DES OSES
SUR LES AGGLUTININES

Nous avons montré les effets inhibiteurs du sérum de lapin sur les 3 agglutinines étudiées, quand son intervention précède celle des agglutinines, et rappelé à ce propos l'interprétation donnée par certains auteurs de ce phénomène déjà observé pour les agglutinines de *Phaseolus vulgaris* (109), *Vicia leganyana* (166), *Sambucus nigra* (167) : plutôt que les protéines, ce sont des molécules relativement simples qui seraient responsables de cette propriété du sérum .

Or, par ailleurs, l'étude de la structure des substances de groupe sanguin a tiré grand profit des lectines et de la possibilité de faire disparaître leur action spécifique en présence de certains oses. Outre la nature de ces oses, l'accent a été mis par Mäkelä (171), sur le rôle joué, dans le cycle pyranoside, par les positions relatives des OH au niveau des carbones 3 et 4 : d'après leur situation respective , on peut reconnaître 4 catégories de sucres : figure 29.

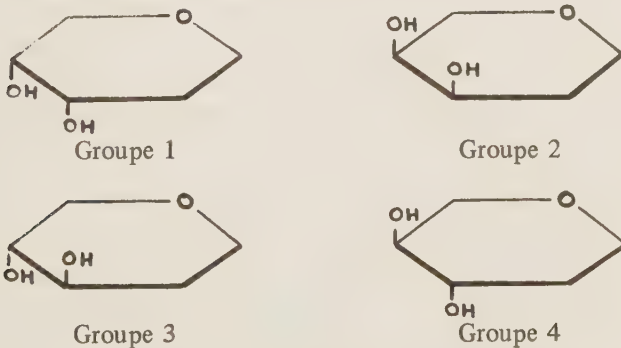


Figure 29 - Classification des pyranosides selon Mäkelä.

On peut résumer ainsi les connaissances acquises dans ce domaine, des relations entre les oses et les phythémagglutinines.

Parmi les sucres appartenant au groupe 1 de Mäkelä, le L-fucose est particulièrement intéressant puisque responsable de la spécificité H au niveau des substances de groupe sanguin.

Les agglutinines anti-H de *Lotus tetragonolobus*, *Lotus siliquosus*, *Ulex europaeus*, *Ulex nanus*, sont préférentiellement inhibées par ce sucre comme l'est d'ailleurs le sérum d'anguille (54).

Des molécules plus complexes contenant le L-fucose en position terminale présentent une activité supérieure au sucre de base : l' α -méthyl fucopyranoside inhibe mieux la lectine de *Lotus tetragonolobus* (172), ou le sérum d'anguille (173) que le β -méthyl fucopyranoside ou le L-fucose seul. On a pu en déduire qu'au niveau des récepteurs H érythrocytaires, le L-fucose était lié aux oses sous-jacents par une liaison α . Cette observation illustre l'importance des modes de liaisons contractées par les sucres, indépendamment de leur propre configuration, dans l'activité des molécules auxquelles ils appartiennent.

La salicine, qui, par sa structure, doit à priori être rangée dans le groupe 3, montre cependant des propriétés inhibitrices de lectines capables d'agglutiner spécifiquement les hématies de groupe O ou A2. Mais ces lectines anti-H inhibées par la salicine, telles *Cytisus sessilifolius* et *Laburnum alpinum* (174) ne le sont pas par le L-fucose, et réciproquement. Ces oses définissent donc deux groupes de lectines anti-H. Il faut toutefois signaler que les *Ulex* assurent le passage entre les 2 puisque leurs agglutinines sont inhibées par l'une et l'autre molécule osidique, avec une efficacité nettement plus marquée pour le L-fucose.

Quelques auteurs (175) en ont déduit qu'il existait à la surface des hématies O, 2 types de sites antigéniques, révélables grâce à des lectines type *Lotus*, ou à des lectines type *Cytisus*.

Le 2ème groupe de Mäkelä renferme les 2 autres sucres immuno-dominants du système ABO : la N-acetyl D-galactosamine pour le groupe A, et le D-galactose pour le groupe B.

Plusieurs lectines sont inhibées par la N-acétyl-D-galactosamine et manifestent donc des propriétés anti-A très nettes : *Vicia Cracca*

(176), *Phaseolus limensis* (177), *Dolichos biflorus* (178) ; il en est d'ailleurs de même pour l'agglutinine extraite d'*Helix pomatia* (179).

D'autres phytohémagglutinines possèdent une spécificité encore plus stricte puisque non inhibées par la N-acétyl-D-galactosamine, mais seulement, et comme la plupart des sérums humains anti-A, par le disaccharide O- α -N-acétyl-D-galactosaminoyl-(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactose (180).

Mais il est surprenant de constater que des lectines uniquement inhibées par la N-acétyl-D-galactosamine ne réclent, contre toute attente, aucune spécificité à l'encontre des hématies A. La «PHA» extraite de *Phaseolus vulgaris* entre dans cette catégorie, si l'on fait la réserve que de fortes doses de N-acétyl-D-galactosamine sont nécessaires pour abaisser son pouvoir hémagglutinant (181). D'autre part, la phytohémagglutinine issue de l'arille de divers fusains, dont *Evonymus europaea* inhibée par la N-acétyl-D-galactosamine et le lactose, ne possèdent pas de propriétés anti-A, mais anti-B + H (182).

Ces deux exemples montrent que l'inhibition d'une lectine par un ose responsable d'une spécificité n'implique pas obligatoirement que cette lectine soit elle-même spécifique.

Ayant la même configuration au niveau des carbones 3 et 4, le D-galactose entre dans le même groupe que la N-acétyl-D-galactosamine. Des lectines inhibées par des sucres de ce 2ème groupe (D-galactose et oses apparentés, dont la N-acétyl-D-galactosamine) vont présenter une double spécificité A et B (183).

Quelques agglutinines se montrent plus actives envers les hématies A : *Crotalaria striata*, *Crotalaria usaramoiensis* (184). D'autres ne montrent pas de préférence : *Calpurnia aurea* (185). Enfin, il existe toute une gamme de Légumineuses pour lesquelles l'activité anti-B domine : *Sophora japonica*, *Coronilla varia*, *Bandeiraea simplicifolia* (graines vieilles), *Caragana frutex* var. *latifolia* (extraits concentrés).

Il est possible, en ajoutant à l'agglutinine un des 2 oses responsables du groupe, de la rendre monospécifique : Bird (36), en traitant la lectine de *Calpurnia aurea* par le D-galactose , la rend purement anti-A.

L'agglutinine de *Ricinus communis* possède dans ce groupe une place particulière : bien qu'inhibée fortement par les seules molécules appartenant au groupe 2, elle ne possède aucune spécificité (22, 186).

Dans le groupe 3 (comme dans le 4) ne sont présents aucun des sucres responsables au premier chef de la spécificité de groupe sanguin ABO : on ne sera donc pas surpris que les phytohémagglutinines inhibées par les oses appartenant au groupe 3 ne possèdent pas de spécificité vis-à-vis des globules rouges.

Il n'empêche que nombreuses sont les agglutinines inhibées par les seuls sucres du groupe 3 ; elles réagissent donc préférentiellement avec certains sites antigéniques de la surface des hématies, et leur manque de spécificité proviendrait d'une égale répartition entre les différentes catégories de globules, des terminaisons osidiques impliquées dans l'agglutination. Boyd (187) a pu parler de la spécificité des phytohémagglutinines non spécifiques.

Ainsi, les extraits de *Pisum sativum* (188), *Lens culinaris* (189), *Lathyrus latifolius*, *Vicia nana*, *Vicia Faba* (190), *Canavalia ensiformis* (191), sont inhibés par des oses ou des oligosides du groupe 3 ayant pour chef de file le D-mannose.

Le groupe 4 correspond à des sucres non classiques avec les OH des carbones 3 et 4 en position anti (L-glucose, L-mannose) ; ceci explique sans doute que l'on ne connaisse pas de lectines inhibées par ces sucres dits « non naturels ». Quelques molécules en renferment cependant : streptomycine avec N-méthyl-L-glucosamine (187), extraits de *Pascaris equorum* avec dideoxy-L-mannose (192), antigènes des Salmonelles (193).

Enfin, d'autres hémagglutinines végétales échappent à une répartition basée sur une étude de l'inhibition par des oses simples, appartenant aux 4 groupes précédents :

- Soit parce qu'elles réagissent avec des terminaisons osidiques bien précises et différentes des récepteurs des groupes sanguins du système ABO. On peut citer celles d'*Arachis hypogea* (194, 195) et de *Bauhinia purpurea* (196) pour lesquelles Boyd est parvenu à déterminer le motif osidique particulier et complémentaire au niveau des hématies.

De même, *Glycine soja* (197) et *Areca catechu* (198) contiennent une lectine anti-T exigeant des récepteurs définis. On a montré, à ce propos, que si les OH en position 3 et 4 ont une importance primordiale, ceux portés par d'autres C peuvent également jouer un rôle important : cas de l'OH en 6 des sucres inhibiteurs de la lectine de *Canavalia ensiformis* (199, 200).

- Soit parce que leur propriétés hémagglutinantes ne sont inhibées par aucun des haptènes de nature osidique mis en jeu par les différents auteurs.

Parmi elles on peut citer *Cladrastis amurensis*, *Atylosia barbata*, *Caragana frutex*, *Dolichos lablab* (en solution saline), *Solanum tuberosum* (33).

Certaines peuvent posséder une spécificité anti-N : *Vicia graminea* (201), *Vicia leganyana*.

L'absence de réactivité a conduit certains auteurs dont Chatto-raj et Boyd (202) à rechercher au niveau des membranes érythrocytaires des récepteurs de nature différente, tels que les amino-acides. Ils ont vu que la créatinine et la sérotonine inhibent l'agglutination anti-A par *Dolichos biflorus* et anti-N par *Bauhinia purpurea* (anti-N après addition de D-galactose).

En ce qui concerne les agglutinines des Mycètes, on ne connaît que peu de résultats de recherches d'inhibition par les oses : les seules études antérieures que nous ayons trouvées dans la littérature sont limitées à 3 espèces : *Polyporus fomentarius* et *Marasmius oreades* étudiées par Mäkelä (203) et Krüpe (182), *Psalliotia campestris* par Sage et Vasquez (41) C'est la raison pour laquelle il nous a paru opportun d'étendre la recherche des oses inhibiteurs des agglutinines dont nous venons d'examiner l'influence sur la survie des hématies, à d'autres espèces disponibles.

MATERIEL ET METHODES.

Nous avons mis en jeu les champignons suivants sous forme d'extraits purifiés selon le cas par le sulfate d'ammonium ou par l'alcool-acétone :

Sulfate d'ammonium : *Clitocybe geotropa*, Fr. ex. Müller, *Clitocybe nebularis*, Fr. ex. Batsch, *Inocybe fastigiata*, Fr. ex. Schaef.,

Laccaria laccata, Fr. ex. Scop. var., *amethystina*, Bull., *Laccaria laccata*, Fr. ex. Scop., var. *proxima*, Boud., *Lactarius controversus*, Fr. ex. Pers., *Lactarius deliciosus*, Fr. ex. L., *Lactarius hygrynus*, Fr., *Lactarius quietus*, Fr., *Lactarius torminosus*, Fr. ex. Schaef., *Lactarius vellereus*, Fr., *Marasmius confluens*, Fr. ex. Pers., *Phallus impudicus*, L. ex. F., *Pholiota squarrosa*, Fr. ex. Müller., *Polyporus cristatus*, Pers., *Polyporus sulfureus*, (Bull.ex.F.), Karsten, *Psalliota campestris*, Lange., *Russula cyanoxantha*, Fr. ex. Schaef., *Russula nigricans*, Fr. ex. Bul., *Russula vesca*, Bres.

Alcool-acétone : *Boletus chrysenteron*, Bul., *Boletus sub-tomentosus* Fr.

Les substances ci-après ont été essayées en solution à 2 p.cent, ou à saturation en cas de solubilité moindre, avec chacune des agglutinines, selon la technique quantitative exposée antérieurement (p. 47)

Groupe 1

D - Arabinose
L - fucose
D - ribose

Groupe 2

L - arabinose
(dulcitol)
D - fucose
D - galactose
D - galactosamine
N - acetyl - D - galactosamine
lactose (+ groupe 3)
melibiose (+ groupe 3)
stachyose (+ groupe 3)

Groupe 3

D - cellobiose
D - fructose
fructose diphosphate de Ca
D - glucose
2 desoxy - D - glucose
glucose penta acétate
D - glucosamine
N - acétyl - D - glucosamine
D - lyxose
maltose
(D - mannitol)
D - mannose
raffinose (+ groupe 2)
saccharose
salicine
tréhalose
D - xylose

Groupe 4

L - glucose
 L - rhamnose
 L - sorbose
 (streptomycine)
 L - xylose

Polyosides apparentés au groupe 3

dextran 40
 dextran 80
 ficoll
 glycogène
 héparine

Dans la présentation ultérieure des résultats, nous désignerons simplement les oses par les trois premières lettres de leurs noms :

N - A - D gal	= N acétyl D-galactosamine
D - ara	= D - arabinose
raf	= raffinose
D - N - glu	= D - glucosamine

RESULTATS

OSÉS DU GROUPE 1

	D ara		L fuc		D rib	
	+	-	+	-	+	-
<i>Boletus chrysenteron</i>			5			
<i>Boletus subtomentosus</i>						
<i>Clitocybe geotropa</i>	8				11	
<i>Clitocybe nebularis</i>		18				18
<i>Inocybe fastigiata</i>		10	12			12
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>amethystina</i>						
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>proxima</i>				17	10	
<i>Lactarius controversus</i>	3				8	
<i>Lactarius deliciosus</i>						
<i>Lactarius hyssiginus</i>	6		6		6	
<i>Lactarius quietus</i>						
<i>Lactarius torminosus</i>	53		21		16	
<i>Lactarius vellereus</i>	2		5			
<i>Marasmius confluens</i>	2		5		3	
<i>Phallus impudicus</i>	7		5			
<i>Pholiota squarrosa</i>		37		79		
<i>Polyporus cristatus</i>	5		7		5	
<i>Polyporus sulfureus</i>	4		9		4	
<i>Psalliota campestris</i>	10		15		12	
<i>Russula cyanoxantha</i>						
<i>Russula nigricans</i>					7	
<i>Russula vesca</i>	5		12		9	
Anti - A (sérum)						
<i>Phaseolus vulgaris</i>						

TABLEAU XIII

Sous les signes + : pourcentage de stimulation

Sous les signes - : pourcentage d'inhibition

OSÉS DU GROUPE 2

	L ara		dul		D fuc		D gal		D-N gal		N-A D-gal		lac		mel		sta	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Boletus chrysenteron</i>				19				8		7		10	15					
<i>Boletus subtomentosus</i>				9				7		7			30					
<i>Clitocybe geotropa</i>	5		4			8					9				7		7	
<i>Clitocybe nebularis</i>		24		7		25		30		24		27		39		24		27
<i>Inocybe fastigiata</i>		73		4		91		93		90		100		100		100		60
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>amethystina</i>								4		6								
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>proxima</i>	12										20		11		7		9	
<i>Lactarius controversus</i>				6														3
<i>Lactarius deliciosus</i>				12				6		9		8	7					
<i>Lactarius hysginus</i>	5		4		5		4		2		3		7		6		5	
<i>Lactarius quietus</i>				4				4		5			17			3		
<i>Lactarius torminosus</i>	24		12		17		24		10		13		26		25		23	
<i>Lactarius vellereus</i>	5		2		3				2			62		13		5		
<i>Marasmius confluens</i>	3		3		4				4			9	15		3		3	
<i>Phallus impudicus</i>			12			13	9				13		6					
<i>Pholiota squarrosa</i>	8		7		13						10			6	10			
<i>Polyporus cristatus</i>	9		7		5		5		7			4	5		7		5	
<i>Polyporus sulfureus</i>	4						20		17		17		25		9			
<i>Psalliota campestris</i>	8			9	9		10		28				31					
<i>Russula cyanoxantha</i>															6			
<i>Russula nigricans</i>	2		10									12		33				
<i>Russula vesca</i>	4			7	4		6		12		13		11				8	
Anti-A (sérum)												8						
<i>Phaseolus vulgaris</i>												2						

TABLEAU XIV

OSÉS DU GROUPE 3

	D cel		D fru		fru diP		D glu		2 d D-glu		p A glu		D-N glu		N-A D-glu		D lyx	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Boletus chrysenteron												13		7				
Boletus subtomentosus														14				
Clitocybe geotropa			5		7		5		4						13		8	
Clitocybe nebularis								8						6			11	
Inocybe fastigiata					15		16		22	5	3				15	11		
Laccaria laccata var. amethystina		4												6				
Laccaria laccata var. proxima			8		22		19		19	16	19		19		18			
Lactarius controversus							2		3	2			12					
Lactarius deliciosus													11	2				
Lactarius hyginus	7		5		5		5		5	4	3			6		3		
Lactarius quietus									5	8				5		4		
Lactarius torminosus	24		21		21		19		26	18	10		20		13			
Lactarius vellereus	2		5		2		2		2			7		3		3		
Marasmius confluens	4		3		4				4	2	2					2		
Phallus impudicus	11		3		21		9		10				8	19		10		
Pholiota squarrosa	10				10		11			10		8		7		5		
Polyporus cristatus	6		9		7		5		5			7		8		5		
Polyporus sulfureus						9	3		4			8						
Psalliota campestris	12		15		14								28		16			
Russula cyanoxantha																		
Russula nigricans			2		4							4		4				
Russula vesca									8	7			14	3				
Anti-A (sérum)													7			4		
Phaseolus vulgaris													4					

TABLEAU XV

OSES DU GROUPE 3 (suite)

	mal		D ^{ol} man		D man		raf		sac		sal		tré		D xyl	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Boletus chrysenteron</i>																
<i>Boletus subtomentosus</i>																
<i>Clitocybe geotropa</i>			6				5		5				5		5	
<i>Clitocybe nebularis</i>		7					27								15	
<i>Inocybe fastigiata</i>	9		5		11		12	15		9					12	
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>amethystina</i>										3						
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>proxima</i>	14		12				9	9		18					11	
<i>Lactarius controversus</i>			4							4		3				
<i>Lactarius deliciosus</i>										5						
<i>Lactarius hygginus</i>	5		7		5		4	6		5		6		5		
<i>Lactarius quietus</i>	4		4							6						
<i>Lactarius torminosus</i>	21		22		13		31	32		15		17		16		
<i>Lactarius vellereus</i>	2		6		4		5	5				2				
<i>Marasmius confluens</i>	3		4		4		4	4		4		3				
<i>Phallus impudicus</i>	13		15		4			17		16		5		16		
<i>Pholiota squarrosa</i>	9		11		13		8	3		39				6		
<i>Polyporus cristatus</i>	5		4		5		8	18		6		6		4		
<i>Polyporus sulfureus</i>							8	5		17				7		
<i>Psalliota campestris</i>			11				10	8		8						
<i>Russula cyanoxantha</i>			2													
<i>Russula nigricans</i>							2									
<i>Russula vesca</i>			9				3			12		10				
Anti- A (sérum)			4		7											
<i>Phaseolus vulgaris</i>			7													

TABLEAU XV (suite)

POLYOSIDES APPARENTES AU GROUPE 3

	dex 40		dex 80		fic		gly		hep	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Boletus chrysenteron	8		20		16		23		22	
Boletus subtomentosus	6		24		42		31		30	
Clitocybe geotropa	20		22		19		13		22	
Clitocybe nebularis	14		30		30		14		22	
Inocybe fastigiata	16		21		10		13		20	
Laccaria laccata var. amethystina			3		2		3			
Laccaria laccata var. proxima	32		41		41		14			
Lactarius controversus	6		7		7		13		5	
Lactarius deliciosus	5		10		21		6		11	
Lactarius hygginus	7		7		8		5		8	
Lactarius quietus	11		15		13		13		26	
Lactarius torminosus	>40		>40		33		>40		>40	
Lactarius vellereus	9		14		14		27		12	
Marasmius confluens	3		10		7		14		9	
Phallus impudicus	15		21		21		18		21	
Pholiota squarrosa	5		16		19		11		19	
Polyporus cristatus	>10		>10		>10		>10		>10	
Polyporus sulfureus	4		11		13		2		12	
Psalliota campestris	22		48		45		52		45	
Russula cyanoxantha	6		8		6				4	
Russula nigricans	6		9		6		23		10	
Russula vesca	8		15		15		13		14	
Anti-A (sérum)	5		6		5				8	
Phaseolus vulgaris	7		11		20		5		14	

TABLEAU XVI

OSÉS DU GROUPE 4

	L glu		L rha		L sor		str		L xyl	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>Boletus chrysenteron</i>	5							12		
<i>Boletus subtomentosus</i>										
<i>Clitocybe geotropa</i>	5		8		5		7		8	
<i>Clitocybe nebularis</i>		11	20				8			9
<i>Inocybe fastigiata</i>		75								
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>amethystina</i>										
<i>Laccaria laccata</i> var. <i>proxima</i>	11		12		3		25		8	
<i>Lactarius controversus</i>	4				3					
<i>Lactarius deliciosus</i>										
<i>Lactarius hygginus</i>	4		6		7		5		5	
<i>Lactarius quietus</i>			5						5	
<i>Lactarius torminosus</i>	20		29		19		21		19	
<i>Lactarius vellereus</i>					3		7		1	
<i>Marasmius confluens</i>		22	4		3		4		18	
<i>Phallus impudicus</i>	17		17						16	
<i>Pholiota squarrosa</i>			9				11		8	
<i>Polyporus cristatus</i>	5		9		5		7		6	
<i>Polyporus sulfureus</i>	4		6					12	6	
<i>Psalliota campestris</i>	12		12		12				17	
<i>Russula cyanoxantha</i>							2			
<i>Russula nigricans</i>								54		
<i>Russula vesca</i>	3		3		11			7	7	
Anti-A (sérum)										
<i>Phaseolus vulgaris</i>							9			

TABEAU XVII

DISCUSSION

L'analyse de ces résultats admet deux voies possibles qui consistent, l'une à envisager les espèces et à tenter de les caractériser par leurs inhibitions, l'autre à considérer les oses, ou du moins certains d'entre eux pour comparer leur comportement.

En ce qui concerne les espèces, on reconnaît facilement que certaines d'entre elles, telles *Inocybe fastigiata*, *Pholiota squarrosa*, *Clitocybe nebularis*, ont une sensibilité nettement plus marquée pour les oses de certains groupes. D'autres, au contraire, ne sont inhibées par aucun des sucres mis en jeu, ainsi *Lactarius hysginus* et *Lactarius torminosus*. Les autres enfin ont une sensibilité apparemment sans rapport avec les structures définissant les groupes selon Mäkelä.

Inocybe fastigiata - L'activité agglutinante d'*Inocybe fastigiata* est sensible à tous les oses du groupe 2, le dulcitol excepté. Les substituants éventuels sur les C 2 et 6 ne modifient pas cette propriété. L'inhibition provoquée est toujours puissante, sauf pour le raffinose. Ce cas particulier ne s'explique pas par un encombrement moléculaire, puisque le stachyose conserve, malgré sa nature de tétrose, un effet important. Ce n'est pas non plus le type de liaison fixant le galactose terminal qui rend compte de cette différence car lactose et mélibiose, respectivement porteurs de liaisons β et α , sont tous les deux très efficaces. Cette discordance doit faire considérer ici le raffinose plus comme un sucre du groupe 3, par ses 2 cycles de D-glucose et de D-fructose, que comme du groupe 2, par son seul cycle de D-galactose. Enfin le manque d'effet inhibiteur du dulcitol paraît montrer que la structure cyclique est indispensable.

Les oses des groupes 1 et 3 ne manifestent que des pouvoirs inhibiteurs très modérés et non systématiques. On notera que par l'intensité de son action, le raffinose se rapproche beaucoup plus des quelques sucres actifs du groupe 3 que de ceux du groupe 2.

Le groupe 4 enfin révèle l'importante efficacité d'un seul sucre, le L-glucose.

Nous pensons qu'on peut conclure de ces observations qu'*Inocybe fastigiata* contient une agglutinine dont le site principal de fixation a une structure d'ose du groupe 2. L'action isolée du L-glucose doit correspondre à un autre site ou à une autre agglutinine.

Pholiota squarrosa - Une inhibition marquée est déterminée par le L-fucose : ce résultat confirme la spécificité relative antérieurement signalée par Coulet et Merland (15). L'action importante de la salicine, comparable compte tenu des poids moléculaires, à celle du L-fucose, autorise à rapprocher *Pholiota squarrosa* des lectines anti-H du type *Ulex*, plutôt que de celles du type *Lotus*, sensibles seulement au L-fucose et *Cytisus*, sensibles seulement à la salicine.

Clitocybe nebularis - On peut noter ici encore une hiérarchie dans l'intervention des groupes. Le groupe 2 est privilégié, tous ses représentants, D - galactose en tête, manifestant un effet notable d'inhibition. Les OH des C 2 et 6 ne semblent pas intéressés par la fixation de l'agglutinine puisque les osamines du D-galactose conservent pratiquement l'activité de l'ose initial, de même que le 6 deoxy-D- galactose et le L-arabinose.

Au contraire, une liaison osidique sur le C 1 renforce l'efficacité du galactose : les di, tri ou tétra holosides du groupe (lactose, mélibiose, raffinose, stachyose) manifestent leurs effets sans la diminution qu'on pourrait attendre en raison de l'augmentation du poids moléculaire. On notera au passage que le raffinose se comporte ici en fonction de son reste galactose (groupe 2) et non de ses restes glucose et fructose (groupe 3). La différence entre lactose et mélibiose paraît marquer la priorité de la liaison β sur la liaison α .

Le dulcitol, non cyclique, ne peut être comparé aux autres oses du groupe, et l'inhibition qu'il provoque reste très discrète.

Les oses actifs du groupe 1 ont un effet moindre. La déficience du L-fucose tendrait à prouver qu'ici, contrairement au groupe 2, le C 6 peut gêner la fixation.

Dans le groupe 3, la meilleure position des pentoses vient confirmer cette notion, tandis que la faible réactivité des hexoses et leur distribution indiquent que la structure caractéristique du groupe, au niveau des C 3 et C 4 n'est pas engagée.

Le groupe 4 enfin, ne permet pas de rattacher les inhibitions à une structure commune des oses.

Nous en concluons que le *Clitocybe nebularis* possède une agglutinine dont le site de fixation porte un D-galactose lié selon le type β et que la position des OH en C 3 et C 4 conditionne la fixation puisque tous les oses du groupe ont une activité.

Les inhibitions observées avec les oses des 3 autres groupes ne sont pas en accord avec les structures selon Mäkelä et on doit considérer qu'il s'agit de molécules intervenant par d'autres pôles que les C 3 et 4, sans qu'il soit possible de reconnaître une systématisation : le rendement toujours beaucoup plus faible de ces molécules confirme qu'elles ne correspondent pas au site principal de l'agglutinine.

Il est curieux de constater que *Clitocybe nebularis* a permis à Tetry, Sutton et Moullec (204) de découvrir la première agglutinine spécifique chez les Mycètes, mais que l'activité qu'ils ont observée est nettement anti-A₁. Or les inhibitions que nous venons de rapporter sont en faveur d'une spécificité anti-B.

Nous avons, d'ailleurs, pratiqué les mêmes essais en présence de globules de groupe 0 : le tableau ci-après montre que, à quelques variantes minimes, les sucres actifs sont les mêmes pour les deux types de suspension globulaire (Tableau XVIII).

Effets comparés des sucres actifs sur
l'agglutination provoquée par *Clitocybe nebularis*
sur des globules A ou O

TABLEAU XVIII

A ₁ O			A ₁ O		
D ara	— 18	— 18	D glu	— 8	0
D rib	— 18	— 16	D-N glu	— 6	0
			D lyx	— 11	— 16
L ara	— 24	— 20	mal	— 7	
dul	— 7	— 15	raf	— 27	— 21
D fuc	— 25	— 20	D xyl	— 15	— 12
D gal	— 30	— 22			
DN gal	— 24	— 23	dex 40	+ 14	+ 4
N-A-D gal	— 27	— 25	dex 80	+ 30	+ 6
lac	— 39	— 52	fic	+ 30	+ 6
mel	— 24	— 20	gly	+ 14	+ 4
sta	— 27	— 25	hep	+ 22	+ 3
		A ₁ O			
	L glu	— 11 — 16			
	L rha	— 20 — 8			
	str	+ 8 + 2			
	L xyl	— 9 — 14			

Ces observations nous ont amené à vérifier sur le lot de *Clitocybe nebularis* employé, le degré de spécificité éventuelle, par la simple méthode des dilutions géométriques. Les résultats sont rapportés ci-après et comparés à ceux de Tetry, Sutton et Moullec (204), (tableau XIX).

Titrage d'extraits de *Clitocybe nebularis*

TABLEAU XIX

Glo- bules	Dilution de l'extrait							
	pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Echantillon personnel								
A ₁	++	++	+	(+)	+	-	-	-
A ₂	++	++	++	+	+	(+)	-	-
B	++	++	++	++	+	+	-	-
O	++	++	++	+	(+)	-	-	-
Résultats de Tetry, Sutton et Moullec (185)								
A ₁	++	++	++	+	+	-	-	-
A ₂	++	+	(+)	(+)	-	-	-	-
B	++	+	(+)	-	-	-	-	-
O	++	++	++	(+)	(+)	-	-	-

Ainsi, pour le lot sur lequel nous avons travaillé, la relative spécificité que manifeste l'extrait pour les globules B est en plein accord avec le résultat des inhibitions par les sucres. La divergence avec les résultats de Tetry, Sutton et Moullec est à rapporter à la variabilité des Mycètes déjà signalée pour d'autres espèces (205).

Lactarius torminosus - Aucun des oses mis en jeu n'altère l'efficacité du pouvoir agglutinant. Rappelons ici que les agglutinines de certaines semences sont connues pour manifester la même insensibilité : nos

essais sur *Phaseolus vulgaris* pris comme témoin, réserve faite de la très discrète action de la N-acétyl-D-galactosamine sur laquelle nous reviendrons, confirment les résultats déjà acquis dans ce domaine. Aux concentrations utilisées, nulle dépression de l'agglutinine n'est observée dans un cas comme dans l'autre.

Mais si *Lactarius torminosus* n'est pas inhibé par les oses et holosides que nous avons employés, il ne leur est pas indifférent puisque, sans exception, toutes les substances essayées ont déterminé le renforcement de l'effet agglutinant, dans des proportions toujours supérieures à 10 p. cent, et dépassant parfois 40 et 50. L'examen des résultats laisse paraître une relation entre l'importance du poids moléculaire et le pouvoir stimulant, les di, tri, tétra et surtout polysides ayant les effets les plus élevés, compte tenu de la concentration constante utilisée. Inversement les osamines sont les moins efficaces.

On doit, pour conclure, tenir compte d'un masquage d'un éventuel effet inhibiteur par l'action stimulante non spécifique des oses : ou bien même inhibiteurs, certains oses provoquent une stimulation parce qu'ils sont en excès, ou bien l'agglutinine de *Lactarius torminosus* s'unit seulement à des structures osidiques complexes, comme le font les isoagglutinines humaines, ou à des structures non osidiques, que nous n'avons pas envisagées, telles celles des amino-acides.

Les résultats obtenus avec *Lactarius hysginus* nous inclinent à préférer cette deuxième éventualité.

Lactarius hysginus - Les difficultés d'interprétation rencontrées dans le cas précédent disparaissent ici : si aucun ose ou oside n'est inhibiteur, aucune stimulation appréciable n'est non plus observée, même en présence de polysides, les valeurs n'atteignent 8 p. cent qu'avec certains d'entre eux. On peut donc ici admettre que seules des structures osidiques complexes ou des structures non osidiques sont capables de simuler le site récepteur. Une situation analogue est celle des iosagglutinines humaines, seulement inhibées par des substances de groupe sanguin. La technique sensible que nous avons appliquée nous a cependant permis de constater la légère inhibition du sérum anti-A par la N-acétyl-D-galactosamine, ose terminal de la substance A.

Pour les autres espèces, il nous paraît impossible de tenter des conclusions cohérentes. Toutefois, certaines comparaisons méritent d'être faites et certains résultats d'être soulignés.

En ce qui concerne *Laccaria laccata*, on notera la très nette différence de comportement des variétés *amethystina* et *proxima*. La variété *amethystina*, peu sensible, est faiblement inhibée par D-galactose, D-galactosamine, D-glucosamine et cellobiose. *Laccaria laccata proxima*, légèrement sensible au lactose est nettement mieux inhibée par le L-fucose : cette particularité est en plein accord avec la spécificité anti-O et anti-A₂, soit anti -H, décrite par Raszeja (206).

Ainsi, la différence variétale est-elle indiscutablement reflétée par les agglutinines.

On remarquera également certaine convergence entre *Russula nigricans* et *Lactarius vellereus*, qui sont sensibles aux 3 oses ou osides suivants : N-acétyl-D-galactosamine, lactose, glycogène. Toutefois, on notera que la valeur des effets inhibiteurs observés n'est pas comparable d'une substance à l'autre pour les deux champignons, et que le glycogène, très actif, intervient peut-être en tant qu' α -glucoside, puisque glucose et cellobiose restent inefficaces. Enfin, *Russula nigricans* s'individualise nettement par l'action de la streptomycine.

Avant d'étudier les résultats sous leur deuxième aspect, c'est-à-dire en considérant les oses, nous commenterons les observations faites à propos des agglutinines prises comme référence : l'isoagglutinine anti-A, et celle de *Phaseolus vulgaris*.

Isoagglutinine anti-A - Les travaux antérieurs n'avaient permis la mise en évidence d'aucun effet inhibiteur de la part des oses simples, et seules les structures complexes, telles qu'elles doivent figurer à la surface des globules ou dans les substances de groupe solubles semblaient à même de se combiner à l'isoagglutinine anti-A, selon Boyd (180). La sensibilité de la technique automatique nous a permis d'observer l'effet inhibiteur discret de la N-acétyl D-galactosamine. La connaissance, aujourd'hui acquise de la structure responsable de la spécificité A, qui comporte la N-acétyl-D-galactosamine unie par une liaison α à un D-galactose sous-jacent (207) explique la faiblesse de l'inhibition provoquée par la seule N-acétyl-D-galactosamine.

Phaseolus vulgaris - Ici encore la grande sensibilité de la technique nous a permis de déceler le très faible pouvoir inhibiteur de la même acétylgalactosamine. L'agglutinine de *Phaseolus vulgaris* a longtemps été considérée comme réfractaire à toute inhibition par les oses, et Krüpe (182) n'avait obtenu aucun résultat dans ce domaine. Ce n'est que l'utilisation de fortes concentrations de N-acétyl-D-galactosamine qui a permis à Borberg (208) de réaliser l'inhibition de l'hémagglutination comme d'ailleurs celle de la transformation lymphoblastique.

Nous tenterons maintenant, en examinant l'ensemble des résultats de faire quelques observations sur le comportement de certains sucres ou groupes de sucres. Il est évident que le nombre des oses que nous avons pu mettre à l'essai limite la richesse de telles constatations, aussi bien d'ailleurs que de celles qui précèdent.

Les oses du groupe 1 ne présentent pas une activité homogène. L'importance du C 6, absent dans le D-arabinose et le D-ribose, apparaît dans la différence d'effet entre ces 2 pentoses d'une part, et le L-fucose de l'autre, qui est un méthyl-pentose : le D-arabinose et le L-ribose sont actifs tous les deux sur *Clitocybe nebularis* et *Inocybe fastigiata*, et inactifs sur *Laccaria laccata proxima*, le L-fucose ayant une influence exactement inverse.

Cette particularité s'estompe avec *Pholiota squarrosa*, où l'inhibition est déterminée par le D-arabinose et le L-fucose, et non par le D-ribose : la méthylation de C 5 renforce considérablement l'activité mais le simple déplacement de l'OH du C 2 suffit à l'annuler.

Ainsi, selon les cas, l'efficacité des oses de ce groupe peut dépendre d'autres C que les C 3 et C 4, et en particulier de C 2.

Dans le groupe 2, en exceptant le dulcitol, polyol à séparer des oses cycliques, on constate un comportement d'ensemble : si l'on s'en tient aux effets supérieurs à 10 p. cent, les réactions sont homogènes pour tous les autres sucres, la N-acétyl-D-galactosamine seule ayant, dans certains cas une action inhibitrice propre.

Si les C 3 et 4 semblent donc conditionner fondamentalement l'activité des oses de ce groupe 2, des observations particulières peuvent être faites pour 2 d'entre eux : lactose et N-acétyl-D-galactosamine.

Le lactose peut agir mieux que le D-galactose seul. Tel est le cas pour *Clitocybe nebularis*, à propos duquel nous avons précédemment souligné l'avantage de la liaison β . L'importance de cette liaison est confirmée par l'efficacité isolée du lactose sur des espèces comme *Laccaria laccata* var. *proxima*, *Lactarius vellereus*, *Russula cyanoxantha*, *Russula nigricans*, insensibles aux α -galactosides (stachyose, raffinose) et à leurs oses simples constitutifs.

Enfin, le lactose est, après les polysides, le sucre le plus intensément stimulant.

La N-acétyl-D-galactosamine est le sucre le plus souvent inhibiteur, puisque 9 espèces sur 22 étudiées lui sont sensibles.

La fréquence de la sensibilité à la N-acétyl-D-galactosamine, et les grandes différences dans les effets inhibiteurs mesurés font supposer qu'elle intervient de diverses façons. Dans le cas de *Clitocybe nebularis* et *Inocybe fastigiata*, elle agit par son analogie de structure avec les autres sucres du groupe 2, et la substitution acétyl-amine n'apporte pas d'amélioration à son effet. De même, pour *Boletus chrysenteron* et *Lactarius deliciosus*, elle s'aligne sur le D-galactose et la D-galactosamine, alors que les autres sucres du groupe, et spécialement le lactose, sont inactifs : la configuration au niveau des C 3 et 4 n'est donc pas suffisante, et l'on voit que l'engagement du C 1 dans une liaison osidique α ou β supprime toute l'activité, de même que la disparition de l' OH du C 6.

Dans d'autres cas, tels *Psalliota campestris* et *Lactarius vellereus*, dont l'action est fortement déprimée, elle agit spécifiquement avec intensité, et doit représenter une structure analogue, sinon identique, au site de fixation, ou à sa partie terminale : cette spécificité est distincte du groupement terminal de la substance A puisque ces deux espèces n'ont pas de spécificité anti-A.

Pour *Polyporus cristatus*, elle est de même le seul ose efficace, mais avec une très faible incidence, tout comme nous l'observons pour *Phaseolus vulgaris* : comme cette action est isolée au sein du groupe 2, on doit écarter l'hypothèse que la substitution sur le C 2 rend compte de cette modération dans l'efficacité, et il faut admettre que de telles agglutinines

correspondent, soit à un site plus complexe, dont l'acétyl-galactosamine n'est qu'un constituant, soit à un ose manquant à notre échantillonnage.

Il reste enfin le cas d'espèces comme *Marasmius confluens* pour qui l'acétyl-galactosamine est le seul inhibiteur, d'ailleurs modéré, du groupe et qui n'est, en outre, nettement sensible qu'au L-glucose : le manque de points communs entre les structures de ces deux oses oblige à supposer que de telles espèces possèdent deux activités agglutinantes distinctes.

L'examen des résultats obtenus avec les oses du groupe 3 n'autorise aucune remarque générale : comme dans le groupe 1, la structure définissant le groupe au niveau des C 3 et 4 n'est pas l'élément déterminant de la fixation des oses sur les agglutinines.

Le groupe 4 rassemble des sucres dit « non naturels », car il s'agit d'isomères anti rarement isolés chez les êtres vivants : Boyd (209) cite la N-acétyl-D-galactosamine de la streptomycine, le 3-6 dideoxy-L-mannose ou ascarylose de *Parascaris equorum*.

C'est cette particularité qui peut expliquer l'insensibilité générale des phytagglutinines aux oses de ce groupe. Seules des activités modérées et toujours dissociées ont été obtenues avec le L-rhamnose et le L-sorbose : pour Mäkelä (54) le L-sorbose agit sur les agglutinines de *Lathyrus latifolius*, *Vicia Cracca*, *Vicia dumetorum*, le L-rhamnose sur *Bandeiraea simplicifolia*, *Erythrina* sp., *Glycine Soja*. Le L-rhamnose donne, suivant cet auteur ou suivant Krüpe (182) des résultats contradictoires avec *Coronilla varia* et *Sophora japonica*.

De leur action sur les Mycètes, il nous semble qu'on doit retenir les inhibitions déterminées par le L-glucose, inhibitions puissantes pour *Inocybe fastigiata*, notable pour *Marasmius confluens*, discrète pour *Clitocybe nebularis*.

Enfin trois espèces présentent une sensibilité à la streptomycine et parmi elles *Russula nigricans*, qui, affaiblie de plus de 50 %, trouve là son inhibiteur le plus efficace parmi les substances essayées. La constitution chimique de la streptomycine n'exclut pas que le streptose ou la streptidine soient les responsables de cet effet plutôt que la N-acétyl-L-glucosamine.

En ce qui concerne les polyosides, leurs effets sont le plus généralement stimulants. Mais on doit considérer avec une certaine réserve les valeurs que nous avons obtenues : si elles traduisent indiscutablement l'accroissement du taux d'agglutination, il faut rappeler que la concentration initiale en agglutinine et la richesse de la suspension globulaire se prêtent à des mesures très précises dans le cas des inhibitions, mais plus approximatives dans celui des stimulations où la marge de variation possible est située dans une partie moins favorable de la courbe d'étalonnage.

Bien que les polyosides dérivent tous d'oses du même groupe, ce n'est pas leur structure qui explique leur effet : pour une espèce donnée, ces oses sont individuellement inhibiteurs, stimulants ou indifférents alors que les 5 polyosides ont une même action. C'est le cas pour *Clitocybe geotropa*, *Clitocybe nebularis*, *Inocybe fastigiata*.

On peut émettre 2 hypothèse pour expliquer le renforcement de l'agglutination : certains polyosides modifient la constante diélectrique du milieu dans lequel se trouvent les hématies. L'élévation de la constante diélectrique entraîne la baisse du potentiel ζ qui traduit la charge des hématies, et l'agglutination est facilitée. Cette explication a été vérifiée par Pollack et Hager (210) pour le ficoll et le dextran qui, en augmentant la constante diélectrique en fonction de leur concentration, favorisent l'action d'anticorps anti-D.

L'autre hypothèse tient compte de la fixation de certaines substances à la surface des hématies, dont on sait l'aptitude à retenir par exemple les antigènes glycoprotidiques. Barna (211) place la streptomycine dans les antibiotiques qui se lient, in vitro, irréversiblement aux globules. Il est donc concevable qu'elle intervienne directement sur la charge des globules.

On peut proposer un troisième mécanisme en supposant que les agglutinines, par un site différent du site de fixation globulaire, peuvent, comme le font certaines lectines, entre autres la concanavoline selon Goldstein (212) se combiner aux polyosides, et que ceux-ci facilitent l'agglutination par leur effet propre sur la charge de complexes hématie-agglutinine, ou par leur capacité à s'unir à plusieurs de ces complexes.

Le fait que certaines espèces, dont *Lactarius torminosus* est le meilleur exemple, soient aussi stimulées par des oses simples de groupes et de structures différents, incline à considérer que de telles substances n'agissent pas après fixation spécifique, mais plutôt par leur influence sur une propriété physique du milieu, à l'instar des polyosides modifiant la constante diélectrique.

CONCLUSIONS GENERALES.

Dans l'intention d'étudier quelques propriétés des hémagglutinines des Mycètes, nous avons été conduit d'abord à choisir des méthodes de purification et à les adapter à ces agglutinines : la mise en jeu successive d'une fixation puis d'une élution en présence d'hématies formolées nous a permis de séparer l'hémagglutinine de *Lactarius controversus*, et celle de *Clitocybe geotropa*, comme celle de *Phaseolus vulgaris*. Mais si, pour ces espèces, nous avons pu constater la supériorité des hématies de poulet par rapport aux hématies humaines, nos essais sur un total de 28 espèces différentes ont montré que ce comportement favorable n'était pas la règle et ont mis en évidence l'existence :

- d'une part d'hémagglutinines à élution spontanée rapide type *Phallus impudicus* ;

- d'autre part d'hémagglutinines à fixation irréversible, au moins dans les conditions réalisées : les agglutinines de ce type qui semblent fréquentes chez les Mycètes où nous en avons caractérisé 16 sur 28 étudiées, restent liées aux hématies formolées malgré le traitement par la chaleur ou les solutions hypertoniques. Telles sont les hémagglutinines de *Polyporus cristatus*, *Russula cyanoxantha*, ainsi que celles de tous les bolets étudiés.

Des hémagglutinines végétales, aussi énergiquement fixées, ainsi observées pour la première fois, pouvaient déterminer sur les globules des changements définitifs et assez conséquents pour modifier leur comportement ultérieur dans l'organisme.

C'est ce qui nous a amené à l'étude comparée de la survie des hématies chez le lapin, après action de l'agglutinine de *Phaseolus vulgaris* pris comme référence, et d'une agglutinine de chacun des deux types les plus intéressants : *Lactarius controversus*, éluable à chaud, *Boletus subtomentosus*, non éluable.

Pour ces essais, l'agglutination des hématies a été facilement obtenue dans le cas de *Boletus subtomentosus* avec un simple extrait brut du champignon. Cependant, l'irréversibilité de la liaison entre l'agglutinine du bolet et les hématies a eu pour nous, en dehors du fait qu'il n'a pas été possible de préparer cette mycohémagglutinine dans un état de pureté très poussée, une autre conséquence : les méthodes de titrage les plus intéressantes n'ont pu être appliquées dans ce cas. L'inconvénient est mineur dans le cadre d'une étude de survie où l'essentiel est de connaître l'ordre de grandeur de l'agglutination, le phénomène à observer dans le détail étant la survie ultérieure des globules, mesurable ensuite par des procédés de marquage isotopique précis.

Toutefois, pour pouvoir aborder l'étude des oses inhibiteurs, il n'était plus possible de se contenter pour les mycoagglutinines non éluables, et en particulier celle de *Boletus subtomentosus*, d'un titrage approximatif. C'est pourquoi nous nous sommes alors tourné vers une autre méthode de dosage.

La mise en oeuvre de celle-ci a nécessité une purification des matériels par des voies moins spécifiques que celles appliquées aux agglutinines éluables, mais suffisamment efficaces pour priver tous les extraits, d'une part de leurs oses dialysables, et d'autre part débarrasser les préparations issues des bolets d'un abondant mucilage.

Nous y sommes parvenu par précipitation alcoolique et acétonique (*Boletus chrysenteron* et *Boletus subtomentosus*), sauf quand une simple précipitation au sulfate d'ammonium a pu suffire à l'obtention d'extraits assez fluides et concentrés (*Clitocybe geotropa*, *nebularis* ; *Inocybe fastigiata* ; *Laccaria laccata amethystina*, *proxima* ; *Lactarius controversus*, *deliciosus*, *hysginus*, *quietus*, *torminosus*, *vellereus* ; *Marasmius confluens* ; *Phallus impudicus* ; *Pholiota squarrosa* ; *Polyporus cristatus*, *sulfureus* ; *Psalliota campestris* ; *Russula cyanoxantha*, *nigricans*, *vesca*).

Ainsi s'est posée très tôt, pour nous, la question de la valeur des méthodes de titrage des hémagglutinines.

La méthode proposée par Wilkie et Becker fait appel au comptage microscopique des cellules restées libres après addition de quantités croissantes d'agglutinine à une suspension d'hématies de concentration définie. C'est certainement le plus apte à apporter des résultats précis et reproductibles, et nous avons pu l'appliquer avec profit, tant à l'isoagglutinine anti-A qu'aux hémagglutinines de *Phaseolus vulgaris* et *Lactarius controversus*.

Cependant, nous nous sommes heurté, au cours de cette étude, à plusieurs difficultés qui en ont limité l'emploi ; la responsabilité en incombe d'abord aux agglutinines elles-mêmes, qui, en se fixant sans élution possible sur les globules, ne permettent pas l'obtention de lignes de régression parfaitement rectilignes : or nous avons vu que la majorité des mycoagglutinines entre dans cette catégorie.

Réciproquement, des cellules type hématies de lapin, se prêtent mal à cause de leur trop grande fragilité, à un tel dosage, et leur remplacement par des hématies humaines plus résistantes ne résout pas le problème puisque l'origine de ces cellules conditionne à la fois la position et la pente des droites de régression.

Enfin, parce que beaucoup de temps doit être consacré à la préparation et à la lecture des résultats, cette technique est difficilement applicable à des études nécessitant l'exécution simultanée de nombreux dosages.

Si, par son principe même, la taille des agglutinats étant impliquée dans le processus de titrage, l'autoanalyseur Technicon interdit une comparaison des forces relatives d'hémagglutinines de diverses provenances, il est parfaitement adapté à des dosages multiples lorsque ceux-ci ne mettent en jeu qu'une seule catégorie d'hématies ou qu'un seul type d'agglutinine. Dans cette technique, les agglutinats, formés dans des conditions rigoureusement standardisées, sont décantés et séparés des hématies libres qui sont mesurées par photo-colorimétrie.

Nous l'avons utilisée pour la première fois dans une étude de l'inhibition de l'hémagglutination, par des molécules osidiques : grâce à la sensibilité de la méthode, nous avons pu mettre en évidence des stimulations ou des inhibitions relativement faibles de l'hémagglutination, qui auraient été inapparentes si nous avions utilisé les techniques classiques. On peut cependant reprocher à cette méthode d'être très exigeante quant à la force des hémagglutinines ; la nécessité de préparer des mycohémagglutinines de haut titre a écarté de notre étude des extraits trop peu actifs ou trop peu abondants.

L'étude de la survie des hématies de lapin en présence des agglutinines de *Lactarius controversus* et *Boletus subtomentosus*, comparée

à celle de *Phaseolus vulgaris* a été faite d'abord par marquage au ^{51}Cr des hématies, agglutination in vitro et réinjection des hématies marquées agglutinées.

Nous avons pu constater l'absence totale d'effet des doses faibles alors que les doses équivalentes de *Phaseolus vulgaris* entraînent un retrait temporaire d'un minime pourcentage d'hématies.

Les doses fortes, produisant in vitro l'agglutination totale des échantillons globulaires mis en jeu, nous ont permis de mettre en évidence le retrait immédiat, mais pas instantanément total, d'une quantité notable d'hématies. Ces hématies, ou plutôt ces agglutinats, sont retirés de la circulation dans les 24 ou 48 premières heures suivant l'injection. Nous attribuons ce retrait à des raisons mécaniques ; la scintigraphie, et surtout le comptage de la radioactivité des viscères après autopsie, autorisent à assigner aux capillaires spléniques et hépatiques le rôle essentiel dans son déroulement. L'importance de cette séquestration initiale diffère pour les deux agglutinines employées pourtant à doses équivalentes et peut traduire l'inégale sensibilité des hématies humaines nécessaires au titrage. C'est un aspect possible de la spécificité des agglutinines dites « non spécifiques ».

Après cette phase primaire de retrait, les hématies marquées persistent dans la circulation et leur durée de vie s'avère strictement normale : compte tenu de l'absence d'hématies libres après l'action des agglutinines, ces hématies marquées à survie normale proviennent d'agglutinats dont elles ont été dissociées et prouvent, comme les doses faibles l'avaient déjà montré, que l'action des agglutinines n'altère pas la survie des globules qui les ont fixées. La recherche d'une relation entre les agglutinines et le complément sérique n'a pas abouti, le complément étant resté, in vitro, indifférent à la présence des agglutinines.

Nous avons également tenté de suivre le sort des hématies d'animaux traités directement par injection intraveineuse d'agglutinine, la durée de vie globulaire étant mesurée par l'emploi du DF^{32}P . L'agglutinine de *Lactarius controversus* ainsi introduite à forte dose n'a aucunement perturbé les courbes de survie des hématies. Le mode de mise en contact entre agglutinine et globules a donc une importance fondamentale. Le plasma est responsable de cette particularité : nous avons en effet constaté son rôle

inhibiteur, déjà connu pour certaines lectines, mais nos essais in vitro coïncident avec ce que la survie des hématies vient de nous montrer : ajouté à l'agglutinine avant les globules, le plasma ou le sérum empêche l'agglutination : c'est la situation créée chez les lapins auxquels l'agglutinine de *Lactarius controversus* est injectée dans la veine ; ajouté aux agglutinats déjà constitués, le plasma ou le sérum abaisse à peine le titre agglutinant : c'est la situation créée chez les lapins qui ont reçu par voie veineuse leurs propres hématies déjà agglutinées in vitro en l'absence de plasma.

Ces groupes de faits expérimentaux réalisés avec les agglutinines des Mycètes, c'est-à-dire la possibilité ou l'impossibilité de libérer une agglutinine, selon le cas, de sa combinaison avec les globules, la propriété inhibitrice du plasma de lapin, la survie conservée des hématies malgré la fixation de l'agglutinine, nous ont amené à rechercher les sites possibles auxquels les agglutinines des Mycètes peuvent s'unir : une étude du pouvoir inhibiteur des oses, des oligosides et de certains polyosides, a été conduite en suivant les conceptions de Mäkelä (54) et Krüpe (182).

Nous avons pu, en menant les recherches sur 22 espèces de champignons, et à titre comparatif sur le sérum humain anti-A et sur l'extrait de *Phaseolus vulgaris*, mis en présence de 39 substances, observer les effets inhibiteurs et les effets stimulants de l'activité agglutinante.

Certaines espèces ont réagi en accord avec les substances définissant les groupes selon Mäkelä : ainsi, tous les oses du groupe 2 inhibent l'agglutinine d'*Inocybe fastigiata*, ce qui montre que chez les Mycètes, des agglutinines peuvent être, comme chez les Spermaphytes, sensibles à des structures très simples, ici la configuration des carbones 3 et 4, seul élément commun aux oses actifs.

Clitocybe nebularis, également inhibé par les oses du même groupe, permet de définir un site réactif plus précis, puisque les différences d'intensité dans les réponses nous ont amené à considérer le D-galactose engagé par le C 1 dans une combinaison β osidique comme la structure la plus efficace. Une telle propriété devait correspondre à une spécificité anti-B : nous l'avons vérifiée sur l'échantillon mis en expérience. Cette spécificité, d'ailleurs relative, montre la variabilité de certaines espèces, puisque *Clitocybe nebularis* a été étudié comme anti-A par Tetry, Sutton et Moullec (204).

La sensibilité de ces 2 espèces au D-galactose appelle une application importante, car il est vraisemblable que ces agglutinines pourront être séparées spécifiquement sur un support comme le Sepharose, de même que celle de *Canavalia ensiformis* (55) puis celle de *Pisum sativum* (56) sont purifiées grâce à leur affinité pour le glucose par passage sur Sephadex.

Une autre agglutinine à spécificité relative a donné lieu à des constatations intéressantes pour le rapprochement entre agglutinines des Mycètes et lectines des Spermaphytes : *Pholiota squarrosa*, anti-H est sensible au L-fucose et à la salicine, ce qui le place dans les lectines du type *Ulex*, distinct des types *Lotus* et *Cytisus*.

Cet exemple met aussi en évidence la précision avec laquelle peuvent être définies les structures actives : à côté du L-fucose, *Pholiota squarrosa* est inhibé dans des proportions voisines par le D-arabinose, alors que le 3e sucre du groupe 1, le D-ribose, différent des 2 précédents par la seule position de l'OH en 2, est inactif.

Une même finesse apparaît pour ces 3 sucres, dans le comportement des 2 espèces citées au début, puisque *Inocybe fastigiata* et *Clitocybe nebularis*, identiquement sensibles au D-arabinose et au D-ribose, malgré l'inversion de l'OH en 2, sont indifférents au L-fucose, porteur d'un CH₃ en C 5.

À côté de ces possibilités, des espèces comme *Boletus chrysenteron* ou *Lactarius deliciosus*, manifestent une affinité pour un type de cycle précis au sein du groupe 2, puisque seuls D-galactose, D-galactosamine et N-acétyl-D-galactosamine diminuent leur activité. L'inhibition, comparable pour les 3 molécules est modérée, montrant que ce cycle fondamental galactose ne représente pas exactement ou totalement le site récepteur.

Les sucres dits non naturels, du groupe 4, offrent un comportement très remarquable, inconnu sous cette forme et cette intensité dans les agglutinines de Spermaphytes, avec la puissante inhibition provoquée par le L-glucose sur *Inocybe fastigiata*, et par la streptomycine sur *Russula nigricans*. Il n'est pas inutile de rappeler ici que, parmi les rares espèces connues pour synthétiser des sucres de ce type figurent des Mycètes.

Il est enfin des espèces pour lesquelles aucun des oses utilisés ne produit la moindre dépression, ainsi *Lactarius torminosus*, ou pour lesquelles une très faible inhibition est seulement manifestée par la N-acétyl-D-galactosamine, ainsi *Lactarius hysginus*. Il s'agit d'espèce dont le groupement correspondant ne figure pas, même approximativement, dans les substances mises en jeu. Nous avons noté la fréquence avec laquelle l'acétyl-galactosamine exerce une action, d'intensité très variable : son effet peut être puissant comme nous l'avons constaté chez *Psalliota campestris*, indépendamment de toute spécificité de groupe. L'intensité même de l'inhibition explique cette absence de spécificité, alors que l'acétyl-galactosamine constitue l'élément terminal du site spécifique de la substance A : le site lui-même est plus complexe, et pour le sérum humain anti-A, c'est la très grande sensibilité de la technique utilisée qui nous a permis d'obtenir une très minime inhibition jusque-là non signalée.

A côté d'effets inhibiteurs ou nuls, la méthode que nous avons utilisée a révélé de nombreux cas de stimulation, c'est-à-dire de renforcement du taux d'agglutination par des substances étudiées. S'il est naturel de trouver les polyosides dans la catégorie des oses le plus souvent et le plus intensément stimulants, puisque certains de ceux que nous avons employés servent classiquement à sensibiliser les réactions d'agglutination à l'aide d'anticorps humains ou animaux, le fait que des oses simples ou des oligosides stimulent parfois d'une manière très notable l'action d'hémagglutinines, nous a paru entièrement nouveau. Pris dans son ensemble, le phénomène paraît dépendre plus de la nature de l'agglutinine que de celle des oses : *Lactarius torminosus* et *Psalliota campestris* sont, dans ce domaine, les espèces les plus sensibles. Il est vraisemblable que les oses n'interviennent pas ici dans un groupement spécifique, mais plutôt en modifiant les conditions physiques du milieu par leur présence en solution ou leur absorption sur les globules.

Ainsi, les hémagglutinines des Mycètes, que nous avons étudiées, peuvent se caractériser par leur fixation sur les hématies, qui n'entraîne, in vivo, pas d'autre dommage apparent que ceux d'ordre mécanique relatifs à l'existence d'agglutinats. Elles s'apparentent à celles des Spermaphytes par leur inhibition plasmatique, et se comportent, à l'égard des oses, d'une manière tantôt conforme à celle de certaines lectines, avec sans doute les mêmes éventualités de spécificité, tantôt d'une

manière qui leur est particulière et qui traduit des spécificités propres, indépendantes des groupes d'antigènes globulaires connus : cette variété de possibilités de combinaisons avec les structures des oses ne fait que confirmer la richesse des capacité de synthèse dont les Mycètes font preuve dans de multiples domaines.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - LANDSTEINER K. - Zentralbl. für Bakter., 1900, t. 28, p. 1132.
- 2 - STILLMARK H. - Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm.* L. und einigen anderen Euphorbiaceen, Inaug. Diss., Dorpat 1888.
- 3 - HELLIN H. - Der giftige Eiweisse körper Abrin und dessen Wirkung auf das Blut., Inaug. Diss., Dorpat 1891.
- 4 - ELFSTRAND M. - Über giftige Eiweisse, welche Blutkörperchen verkleben. Habil., Schr. Upsala 1897.
- 5 - LAU C. - Über vegetabilische Blutagglutinine,, Inaug. Diss., Rostock 1901.
- 6 - LANDSTEINER K. - Wien. Klin. Wschr., 1901, t. 14, p. 1132.
- 7 - RENKONEN K.O. - Ann. Med. exper. Biol. Fenn., 1948, t. 26, p. 66.
- 8 - BOYD W.C., SHAPLEIGH E. - J. Immunol., 1954, t. 73, p. 226.
- 9 - NOWELL P.C. - Cancer Res., 1960, t. 20, p. 642.
- 10 - FORD W.W. - J. Pharmacol. Exper. Therap., 1911, t. 2, p. 285.
- 11 - BOYD W.C., ALMODOVAR L.R., BOYD L.G. - Transfusion, 1966, t. 6, p. 82.
- 12 - ESTOLA E., VARTIA K.O. - Ann. Med. exper. Biol. Fenn., 1955, t. 33, p. 392.
- 13 - BOYD W.C., REGUERA R.M. - J. Immunol., 1949, t. 62, p. 333.
- 14 - ELO J., ESTOLA E., MALMSTROM N. - Ann. Med. exper. Biol. Fenn., 1951, t. 29, p. 297.

- 15 - COULET M., MERLAND A.M. - C.R. Soc. Biol., 1960, t. 154, p. 2271.
- 16 - COULET M., MERLAND A.M. - C.R. Soc. Biol., 1960, t. 154, p. 2293.
- 17 - MERLAND A.M., COULET M. - C.R. Soc. Biol., 1960, t. 158, p. 2348.
- 18 - COULET M., MUSTIER J., MARCHE A.M. - C.R. Soc. Biol., 1964, t. 158, p. 2344.
- 19 - DUBOVOY C., CALDERON S., HERRERA T. - Ann. Inst. Biol. Univ. Mex., 1966, t. 37, p. 9.
- 20 - NORDMAN C.T., de la CHAPELLE A., GRASBECK R. - Acta Medica Scandinavia, 1964, t. 175, p. 412.
- 21 - GUILLOT J., MUSTIER J., BETAÏL G., CHABANIER A.M., COULET M. - C.R. Soc. Biol., 1969, t. 163, p. 152.
- 22 - DRYSDALE R.G., HERRICK P.R., FRANKS D. - Vox. Sang., 1968, t. 15, p. 194.
- 23 - JAFFE W.G., WAGNER F., MARCANO P., HERNANDEZ R. - Acta. Cientif. Venezolana, 1964, t. 15, p. 29.
- 24 - KABAT E.A., HEIDELBERGER M., BEZER S. - J. Biol. Chem., 1947, t. 168, p. 629.
- 25 - JAFFE W.G., GAEDE K. - Nature, 1959, t. 183, p. 1329.
- 26 - SCHEINBERG S.L., WONG D.T.O. - J. Immunol., 1964, t. 92, p. 520.
- 27 - SALGARKAR S., SOHONIE K. - Indian J. Biochem., 1965, t. 2, p. 193.
- 28 - BACHRACH V., BERECHYAHN D., GUREVITCH J. - J. Immunol., 1959, t. 82, p. 116.
- 29 - HUPRIKAR S.V., SOHONIE K. - Enzymologia, 1965, t. 28, p.333.
- 30 - RENKONEN K.O. - Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 1950, t. 28, p. 45.

- 31 - COULET M., CLUZEL R., BEZOU M.J. - Transf., 1956, t. 4, p. 3.
- 32 - RIGAS D.A., OSGOOD E.E. - J. Bioch. Chem., 1955, t. 212, p. 607.
- 33 - SINGH G., VERMA S.D., BIRD G.W.G. - Zeitsch. Immun. Forsch. Exper. Therapie., 1961, t. 121, p. 181.
- 34 - LIS H., FRIDMAN C., SHARON N., KATCHALSKI E. - Arch. Biochem. Biophys., 1966, t. 117, p. 301.
- 35 - BOYDW.C., EVERHART D., Mc MASTER M. - J. Immunol., 1958, t. 81, p. 415.
- 36 - BIRD G.W.G. - Erythrocyte agglutinins from plants Ph. thesis (University of London, 1958).
- 37 - BOURRILLON R., FONT J. - Biochim. Biophys. Acta, 1968, t. 154, p. 28.
- 38 - JAFFE W.G., HANNIG K. - Arch. Biochem. Biophys., 1965, t. 109, p. 80.
- 39 - LIS H., SHARON N., KATCHALSKI E. - J. Biol. Chem., 1966, t. 241, p. 684.
- 40 - BORJESON J., BOUVENG R., GARDELL S., NORDEN A., THUNELL S. - Biochim. Biophys. Acta, 1964, t. 82, p. 158.
- 41 - SAGE H.J., VASQUEZ J.J. - J. biol. Chem., 1967, t. 242, p.120.
- 42 - WEBER T., NORDMAN C.T., GRASBECK R. - Scand. J. Haemat., 1967, t. 4, p. 77.
- 43 - MARINKOVICH V.A. - J. Immunol., 1964, t. 93, p. 733.
- 44 - BHATIA H.M., CHAKIM Y., BOYD W.C. - Vox Sang., 1968, t.14, p. 170.
- 45 - BORGOGNINI S. - Atti Soc. Toscana Sci. Naturali, 1966, t.73, p. 91.
- 46 - JONES J.M., CAWLEY L.P., TERESA G.W. - Vox Sang., 1967, t. 12, p. 211.

- 47 - TAKAHASHI T., LIENER I.E. - *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, t. 154, p. 560.
- 48 - FENTON J.W., DUGGLEBY C.R., OTTEN C., STONE C., STONE W.H. - *Vox Sang.*, 1965, t. 10, p. 208.
- 49 - ISHIZAKA K., ISHIZAKA T., LEE E.J., FUDENBERG H. - *J. Immunol.*, 1965, t. 95, p. 197.
- 50 - STENMARK C.G., SAMUELSON G., CARLSON U. - *Llyodia*, 1964, t. 27, p. 226.
- 51 - HERZOG P., SOUCEK J. - *Zeitsch. Immun.*, 1960, t. 119, p.469.
- 52 - RIGAS D.A., JOHNSON E.A. - *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, t.113, p. 800.
- 53 - D'ANTONIO L.E., SCHEINBERG S.L. - *Vox Sang.*, 1965, t. 10, p. 439.
- 54 - MAKELA O. - *Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds*, Helsinki 1957.
- 55 - AGRAWAL B.B.L., GOLDSTEIN I.J. - *Biochem J.*, 1965, t. 96, p. 23.
- 56 - BETAIL G., GUILLOT J., COULET M. - *C.R. Soc. Biol.*, 1969, t. 163, p. 150.
- 57 - HOWARD I.K., SAGE H.J. - *Biochem*, 1969, t. 8, p. 2436.
- 58 - HUMMEL K., SZCZEPANSKI L.V. - *Zeitsch. Immun. Forsch. Exper. Therapie*, 1962, t. 123, p. 259.
- 59 - LEPINE P. - *Techniques de laboratoire en virologie humaine*, Masson & Cie, Paris 1964.
- 60 - SOHIER R. - *Diagnostic des maladies à virus*, Flammarion, Paris 1964.
- 61 - GUILLOT J., COULET M. - *C.R. Soc. Biol.*, 1965, t. 159, p.1985.
- 62 - FILITTI-WURMSER S., JACQUOT-ARMAND Y., WURMSER R. - *Revue d'Hématologie*, 1960, t. 15, p. 201.
- 63 - ANDERSON R.E., WALFORD R.L. - *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1963, t. 40, p. 325.

- 64 - KIDD P. - J. Clin. Path., 1949, t. 2, p. 103.
- 65 - GREENWALT T.J. - J. Laboratory, 1956, t. 48, p. 634.
- 66 - WEINER W. - Brit. J. Haemat., 1957, t. 3, p. 276.
- 67 - RUBIN H. - J. Clin. Pathol., 1963, t. 16, p. 70.
- 68 - FIORI A., MARIGO M., BENCIOLINI P. - Rivista Anat. Pathol., Oncol., 1962, t. 21, p. 20.
- 69 - LANDSTEINER K., MILLER C.P. - J. exp. Med., 1925, t. 42, p. 853.
- 70 - VOS G.H., KELSALL G.A. - Brit. J. Haemat., 1956, t. 2, p.342.
- 71 - ECONOMIDOU J., HUGUES-JONES N.C., GARDNER B. - Vox Sang., 1967, t. 12, p. 321.
- 72 - BECHT H. - J. Immunol., 1968, t. 101, p. 18.
- 73 - BING D.H., WEYAND J.G.M., STAVITSKI A.B. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1967, t. 124, p. 1166.
- 74 - FAUCONNIER B. - Ann. Inst. Past., 1959, t. 96, p. 110.
- 75 - GOODMAN H.S. - Nature, 1962, t. 193, p. 350.
- 76 - FAUCONNIER B. - Ann. Inst. Past., 1958, t. 6, p. 777.
- 77 - FLICK J.A. - Soc. exp. Biol. Med., 1948, t. 68, p. 449.
- 78 - BULTLER W.T. - J. Immunol., 1963, vol. 90, p. 6637.
- 79 - COX C.D., PIRTLE E.C. - Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1956, t. 93, p. 373.
- 80 - VELEZ E., DELTOUR G. - Ann. Endocrinol., 1952, t. 13, p.815.
- 81 - JACQUOT-ARMAND Y., THEOLEYRE M., FILITTI-WURMSER S. - Revue d'Hématologie, 1956, t. 11, p. 63.
- 82 - CALLENDER S.T., RACE R.R. - Ann. Eugen., 1946, t. 13, p. 102.
- 83 - HEIDELBERGER M., TREFFERS H.P. - J. Gen. Physiol., 1942, t.25, p. 523.
- 84 - BOYD W.C., BHATIA H.M., DIAMOND M.A., MATSUBARA S. - J. Immunol., 1962, t. 89, p. 463.

- 85 - MILLER J.T., BOYD W.C., DIAMOND M.A. - Vox Sang., 1967, t. 13, p. 449.
- 86 - WALLER G.R., DASGUPTA B.R., SMITH J.D. - Technic. Bull. Oklahoma. Agricult. Experiment., 1966, t. 119, p. 3.
- 87 - DRESCHER J., HENNESSY A.V., DAVENPORT F.M. - J. Immunol., 1962, t. 89, p. 794.
- 88 - SOLOMON J.M., GIBBS M.B., BOWDLER A.J. - Vox Sang., 1965, t. 10, p. 54.
- 89 - ROSENFELD R.E., HABER G.V. - Automation in analytical Chemistry, Technicon Symposia, 1965, N.Y., p. 515.
- 90 - FILITTI-WURMSER S., JACQUOT-ARMAND Y. - Arch. Sci. physiol., 1947, t. 1, p. 151.
- 91 - SALMON C. - Progrès en Hématologie, B. Dreyfus, Flammarion, Paris 1967, p. 291.
- 92 - FILITTI-WURMSER S., JACQUOT-ARMAND Y., WURMSER R. - Bull. Mathem. Biophys., 1963, t. 25, p. 387.
- 93 - WILKIE M.H., BECKER E.L. - J. Immunol., 1955, t. 74, p.192.
- 94 - GIBBS M.B., AKEROYD J.H. - J. Immunol., 1959, t. 82, p.568.
- 95 - SOLOMON J.M. - Transfusion, 1963, t. 3, p. 185.
- 96 - CHATTORAJ A. - J. Immunol., 1967, t. 98, p. 757.
- 97 - GIBBS M.B. - J. Immunol., 1965, t. 94, p. 55.
- 98 - GOODMAN H.S., MASAITIS L. - Nature, 1965, t. 205, p. 1293.
- 99 - BOWDLER A.J., SWISHFR S.N. - Transfusion (U.S.A.), 1964, t. 4, p. 153.
- 100 - GIBBS M.B., BECKER E.L. - Nature, 1963, t. 198. p. 90.
- 101 - KUANG MING T., SEVERSON C., GOODMAN H.S. - J. Immunol., 1964, t. 93, p. 567.
- 102 - GREENDYKE R.M., SWISHER S.N. - Vox. Sang., 1968, t. 15, p. 321.
- 103 - GIBBS M.B., TUGGLE J.M., CAMP F.R. - Proc. 10th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Stockholm 1964, (1965), p. 520.

- 104 - GIBBS M.B., DREYFUS J.C., AGUILU L.A. - J. Immunol., 1965, t. 94, p. 62.
- 105 - MYHRE B.A., GREENWALT T.J., STEANE E.A. - Proc. 10th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Stockholm 1964, (1965) p. 295.
- 106 - BRIN M., YONEMOTO R.H. - J. biol. Chem., 1958, t. 230, p. 307.
- 107 - NORTHROP R.L., LIENER I.E. - Proc. Soc. exper. Biol. Med., 1959, t. 100, p. 105.
- 108 - LIENER I.E. - Economy Botany, 1964, t. 18, p. 27.
- 109 - ADAMKOVA B., TOBISKA J. - Zeitsch. Immunit., 1960, t.120, p. 90.
- 110 - TOMS G.C., TURNER T.D. - J. Pharm. Pharmacol., 1965, t.17, p. 118S.
- 111 - SOLOMON J.M., GIBBS M.B., BOWDLER A.J. - Vox Sang., 1965, t. 10, p. 133.
- 112 - SOLOMON J.M. - Transfusion, 1964, t. 4, p. 3.
- 113 - HYNES M. - J. clin. Path., 1947, t. 1, p. 25.
- 114 - SANDERS C., SKERRY D.W. - J. clin. Path., 1961, t. 14, p. 298.
- 115 - Mc KERNS K.W., DENSTEDT O.F. - Canad. J. Res., 1950, t. 28, p. 152.
- 116 - MOLLISON P.L., PATERSON J.C.S. - J. clin. Path., 1949, t.2, p. 109.
- 117 - MOLLISON P.L. - Brit. med. J, 1959, t. 2, p. 1123.
- 118 - SELWYN J.G., HACKETT W.E.R. - J. clin. Path., 1949, t. 2, p. 114.
- 119 - JANOL J.H., KAPLAN H.M. - J. clin. Invest., 1960, t. 39, p. 1145.
- 120 - GARDNER E., WRIGHT C.S., WILLIAMS B.Z. - J. lab. clin. Med., 1961, t. 58, p. 743.

- 121 - STEWART W.B., PETENYI C.W., ROSE H.M. - Blood, 1955, t. 10, p. 228.
- 122 - COSTEA N., SCHWARTZ R., - J. lab. clin. Med., 1963, t. 62, p. 869.
- 123 - GRAY S.J., STERLING K. - J. clin. Invest., 1950, t. 29, p. 1604.
- 124 - ASHBY W. - J. exp. Med., 1919, t. 29, p. 267.
- 125 - PRINS H.K. - Vox Sang., 1962, t. 7, p. 370.
- 126 - MALCOLM D. - Blood, 1963, t. 21, p. 8.
- 127 - VIALA J.J., BARBIER Y., BERTHOUX F. - Rev. lyonnaise de Médecine, 1968, t. 17, p. 455.
- 128 - EBAUGH F.G., ROSS J.F., EMERSON C.P. - J. clin. Invest., 1953, t. 32, p. 1260.
- 129 - CLINE M.J., BERLIN N.I. - Blood, 1963, t. 21, p. 63.
- 130 - DORNHORST A.C. - Blood, 1951, t. 6, p. 1284.
- 131 - MOLLISON P.L., VEALL N. - Brit. J. Haemat., 1955, t. 1, p. 62.
- 132 - COHEN J.A., WARINGA M.G.P.J. - J. clin. Invest., 1954, t. 33, p. 459.
- 133 - CLINE M.J., BERLIN N.I. - Blood, 1952, t. 19, p. 715.
- 134 - Mc CURDY P.R. - Blood, 1969, t. 33, p. 214.
- 135 - CLINE M.J., BERLIN N.I. - Blood, 1963, t. 22, p. 459.
- 136 - MARCILESE N.A., FIGUEROAS H.D., KREMENCHUKY S., VAL-SECCHI R.M., CAMBEROS H.R., VARELA J.E. - Am. J. Physiol., 1966, t. 211, p. 281.
- 137 - MATZKE J., MUNKNER T., VIDEBAEK A. - Proc. 7 th Congr. Europ. Soc. Haemat., London 1959, part. II, p. 1077 (1960)
- 138 - MUNKNER T., MATZKE J., VIDEBAEK A. - Acta Med. Scand., 1961, vol. 170, p. 605.
- 139 - EERNISSE J.G., VAN ROOD J.J. - Brit. J. Haemat., 1961, t. 7, p. 382.
- 140 - BOIVIN P., NICOLLO F., FAUVERT R. - Nouv. Rev. fr. Hémat., 1964, t. 4, p. 709.
- 141 - GARBY L. - Brit. J. Haemat., 1962, t. 8, p. 15.

- 142 - EADIE G.S., SMITH W.W., BROWN I.W. - J. gen. Physiol., 1960, t. 43, p. 825.
- 143 - VAN PUTTEN L.M. - Blood, 1958, t. 13, p. 789.
- 144 - HJORT P.F., PAPATUCHIS H., CHENEY B. - J. lab. clin. Med., 1960, t. 55, p. 416.
- 145 - HUGHES JONES N.C., MOLLISON P.L. - Clin. Science, 1956, t. 15, p. 207.
- 146 - PAOLETTI C. - Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1955, t. 93-94, p. 97.
- 147 - BENARD H., GADJOS A., DANTCHEV D. - Rev. fr. Et. clin. et biol., 1961, t. 6, p. 1060.
- 148 - BRADING I., GEORGE E.P., WALSCH R.J. - Austral. J. exper. Biol., 1959, t. 37, p. 37.
- 149 - SUTHERLAND D.A., MINTON P., LANZ H. - Acta Haemat., 1959, t. 21, p. 37.
- 150 - NEUBERGER A., NIVEN J.S.F. - J. Physiol., 1951, t. 112, p. 292.
- 151 - HARRISON B.A., BURWELL E.L., FINCH C.A. - Fed. Proc., 1951, t.10 p. 357.
- 152 - SHUMWAY C. N., BOUKENHEUSER V., POLLOCK D. - J. lab. clin. Med., 1963, t. 62, p. 600.
- 153 - EVANS R.S., BINGHAM L., WEISER R.S. - J. lab. clin. Med., 1963, t.62, p. 559.
- 154 - CLAUSEN E., LARSEN O.E. - Acta Pharmacol. Toxicol., 1965, t. 22, p. 135.
- 155 - HOLMES P.H., DARGIE J.O., Mac LEAN J.M., MULLIGAN W. - J. comp. Path., 1968, t. 78, p. 415.
- 156 - SROCZYNSKI J., JONDERKO G., WATRAS J. - Archivum Immunol. Therap. Experimentalis, 1966, t. 14, p. 228.
- 157 - BUSSIÈRE P. - Travaux du Département de Géologie et de Minéralogie de la Fac. des Sci. de Clermont-Fd, série Documentation, 1969, n° 12.
- 158 - BOVE J.R., EBAUGH F.G., HANOVER N.H. - J. Lab., 1958, t. 51, p.916.

- 159 - HEIMPEL H., FINKE J., KEIDERLING W. - *Germ. Med. Mth*, 1964, t. 9, p. 405.
- 160 - FINKE J., HEIMPEL H., HOFFMANN G., KEIDERLING W. - *Nucl. Med.*, 1965, t. 4, p. 349.
- 161 - MARTINENGHI C., RICCARDI A., BARALDI C. - *Acta Isotop.*, 1965, t. 5, p. 91.
- 162 - CLINE M.J., BERLIN N.I. - *J. Labor. clin. Med.*, 1963, t. 61, p. 249.
- 163 - LEON M.A. - *Science*, 1967, t. 158, p. 1325.
- 164 - SJOQUIST J., STALENHEIM G. - *J. Immunol.*, 1969, t. 103, p. 467.
- 165 - KOLMER J.A., - *Infection, Immunity and Biologic Therapy* - Saunders, Philadelphia, 1923.
- 166 - MAKELA O., HAUTALA T. - *Ann. Med. exp. Fenn.*, 1958, t. 36, p.323.
- 167 - ZAREMBA S. - *Acta Biol. Cracov. (Zoologia)*, 1967, t. 10, p. 233.
- 168 - GODZINSKA H., SCHLESINGER D. - *Arch. Immun. i Terap. Dosw*, 1956, t. 4, p. 71.
- 169 - SPRINGER G.F., ANSELL N.J. - *Proc. Nation. Acad. Sci. U.S.A.*, 1958, t. 44, p. 182.
- 170 - VOAK D., LODGE T.Z., REED J.V. - *Vox Sang.*, 1969, t. 17, p. 134.
- 171 - MAKELA O. - *Proc. 8th Congr. Int. Soc. Blood Transf., Tokyo (1960)* 1962, p. 251.
- 172 - MORGAN W.T.J., WATKINS W.M. - *Brit. med. Bull.*, 1959, t. 15, p. 109.
- 173 - WATKINS W.M., MORGAN W.T.J. - *Nature*, 1952, t. 17, p. 825.
- 174 - BIRD G.W.G. - *Brit, med. Bull.*, 1959, t. 15, p. 165.
- 175 - PLATO C.C., GERSHOWITZ H. - *Vox Sang.*, 1961, t. 6, p. 336.
- 176 - SAINT-PAUL M. - *Transfusion*, 1961, t. 4, p. 1.
- 177 - BOYD W.C. - *Introduction to immunochemical specificity* - Interscience Publishers, 1962, p. 67.
- 178 - KOHLER W., PROKOP O. - *Zeitsch. Immun. Forsch. Allerg. Klin.*, 1967, t. 133, p. 171.
- 179 - UHLENBRUCK G., PROKOP O. - *Vox Sang.*, 1966, t. 11, p. 519.

- 180 - BOYD W.C. - Vox Sang., 1963, t. 8, p. 1.
- 181 - BORBERG H., WOODRUFF J., HIRSCHHORN R., GESNER B.,
MIESCHER P., SILBER R. - Science, 1966, t. 154, p. 1019.
- 182 - KRUPPE M. - Blutgruppenspezifische Pflanzliche Eiweisskörper -
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1956.
- 183 - BIRD G.W.G. - Brit. med. Bull., 1959, t. 15, p. 165.
- 184 - BRILLIANTINE L., ARANDA L.H., FOSTER D.M., ALLEN N.K. -
J. Immunol., 1964, t. 92, p. 555.
- 185 - BIRD G.W.G. - Nature, 1957, t. 28, p. 667.
- 186 - BOYD W.C., WASZCZENKO-ZACHARCZENKO E. - Transfusion,
1961, t.1, p. 223.
- 187 - BOYD W.C. - J. Immunol., 1960, t. 85, p. 221.
- 188 - COULET M., BETAÏL G., GUILLOT J. - Les applications de l'analyse
automatique en Immunologie - Symposium Technicon, 1970 (sous
presse).
- 189 - ENTLICHER G., TICHÁ M., KOSTIR J.V., KOCOUREK J. - Expe-
rientia, 1969, t. 25, p. 17.
- 190 - PERERA C.B., FRUMIN A.M. - Science, 1966, t. 151, p. 821.
- 191 - GOLDSTEIN I.J., IYER R.N., SMITH E.E., SO L.L. - Biochemistry,
1967, t. 6, p. 2373.
- 192 - FOUQUEY C., POLONSKY J., LEDERER E. - Bull. Soc. Chim. biol.,
1957, t. 39, p. 101.
- 193 - WESTPHAL O. - Naturwiss., 1959, t. 46, p. 50.
- 194 - BOYD W.C., GREEN D.M., FUJINAGA D.M., DRABIK J.S.,
WASZCZENKO-ZACHARCZENKO E. - Vox Sang., 1959, t. 4
p. 456.
- 195 - BIRD G.W.G. - Vox Sang., 1964, t. 9, p. 748.
- 196 - WASZCZENKO-ZACHARCZENKO E., BOYD W.C., GILBERT P.L. -
Transfusion, 1962, t. 2, p. 259.
- 197 - BIRD G.W.G. - Experientia, 1963, t. 19, p. 625.

- 198 - BIRD G.W.G. - *Experientia*, 1965, t. 21, p. 5.
- 199 - SO L.L., GOLDSTEIN I.J. - *J. Immunol.*, 1967, t. 99, p. 158.
- 200 - GOLDSTEIN I.J., HOLLERMAN C.E., SMITH E.E. - *Biochemistry*, 1965, t. 4, p. 876.
- 201 - OTTENSOOSER F., SILBERSCHMIDT K. - *Nature*, 1953, t.172, p. 914.
- 202 - CHATTORAJ A., BOYD W.C. - *Vox Sang.*, 1965, t. 6, p. 700.
- 203 - MAKELA O., MAKELA P, KRUPPE M. - *Zeitsch. Immun. Forsch.*, 1959, t. 117, p. 220.
- 204 - TETRY A., SUTTON E., MOULLEC J. - *C.R. Acad. Sci.*, 1953, t.237, p. 1566.
- 205 - COULET M., MUSTIER J., GUILLOT J. - *Rev. de Mycologie*, 1970, t. 35, (sous presse).
- 206 - RASZEJA S. - *Zschr. Arztl. Fortbild.*, 1964, t. 58, p. 801.
- 207 - STAUB A.M.- *Bull., Inst. Pasteur*, 1968, t. 66, p. 1111.
- 208 - BORBERG H., YESNER I., GESNER B., SILBER R. - *Blood*, 1968, t. 31, p. 747.
- 209 - BOYD W.C. - *Fundamentals of Immunol.*, 4e Edit., Interscience Publishers, p. 218.
- 210 - POLLACK W., HAGER H.J. - *Proc 10th Congr. Int. Soc. Blood Transfus.*, Stockholm (1964), 1965, p. 802.
- 211 - BARNA K., BARNOVA E., BELOVA V., SZABAD F. - *V Int. Congr. Chemotherapy Wiener Mediz. Akad.*, 1967, p. 203.
- 212 - GOLDSTEIN I.J., SO L.L., YANG Y., CALLIES Q.C. - *J. Immunol.*, 1969, t. 103, p. 695.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.	1
PREPARATION DES AGGLUTININES.	5
Introduction	7
I - REVUE DES DIFFERENTES METHODES DE PURIFICATION DES HEMAGGLUTININES	8
1 - Procédés non spécifiques	8
- <i>précipitations fractionnées par des solutions salines</i>	
- <i>précipitations fractionnées par des solvants</i>	
- <i>séparation par chromatographie sur colonne</i>	
- <i>séparation par électrophorèse</i>	
2 - Procédés spécifiques	10
- <i>inhibition des hémagglutinines par les oses</i>	
- <i>emploi d'hématies</i>	
II - PURIFICATION DES HEMAGGLUTININES ETUDIEES	13
- Procédé par fixation-élution	14
1 - Matériel et méthodes	14
- <i>antisérums et extraits</i>	
- <i>hématies formolées</i>	
- <i>fixation et élution des agglutinines</i>	
- <i>concentration des éluats</i>	
- <i>recherche et dosage du formol dans les éluats</i>	
- <i>titration rapide des agglutinines</i>	
2 - Résultats	17
- <i>dosage du formol dans les éluats</i>	
- <i>isohémagglutinine anti-A</i>	

- agglutinine de <i>Phaseolus vulgaris</i>	
- myco-hémagglutinines	
- Procédé par précipitation	23
- précipitation par le sulfate d'ammonium	
- précipitation par l'alcool et l'acétone	
DOSAGE DES AGGLUTININES.	25
Introduction	26
I - LES DIFFERENTES METHODES DE L'HEMAGGLUTINATION QUANTITATIVE -	
CHOIX D'UNE TECHNIQUE DE TITRATION	27
1 - Méthode des dilutions géométriques	27
2 - Dosage par absorption	28
3 - Dosage de l'azote de l'anticorps	28
4 - Emploi des isotopes	29
5 - Méthodes photométriques	29
6 - Comptages cellulaires	31
- méthode de Filitti-Wurmser	
- méthode de Wilkie et Becker	
II - METHODE DE WILKIE ET BECKER	34
1 - Matériel et méthodes	34
- préparation des dilutions et suspensions	
- hématies	
- hémagglutinines	
- verrerie	
- température d'expérience	
- agitation des mélanges hématies-agglutinines	
- prise des clichés	
- protocole expérimental	
2 - Résultats	39
- fragilité comparée des hématies de lapin et d'hématies A ₁	
- comparaison de la force relative d'une même quantité d'agglutinine par dosage sur hématies A ₁ et hématies de lapin	
- lignes de régression correspondant à des quantités différentes d'une même agglutinine.	

III - METHODE AUTOMATIQUE D'APRES ROSENFELD	47
Réactifs	49
Etalonnage	50
Protocole expérimental	51
Expression des résultats	53

ETUDE DE LA SURVIE DES HEMATIES DE LAPIN APRES TRAITEMENT PAR LES HEMAGGLUTININES..... 55

Introduction	56
I - PROCEDES DE MARQUAGE	57
1 - Marquage par le chrome radioactif	57
2 - Marquage par le DF ³² P	59
II - MATERIEL ET METHODES	60
1 - Etude de la survie des hématies de lapin, marquées et sensibilisées in vitro	60
a) <i>marquage des cellules</i>	
b) <i>phytohémagglutinines</i>	
c) <i>prélèvement et comptage des échantillons et des organes</i>	
d) <i>scintigraphie</i>	
2 - Etude de la survie des hématies de lapin, marquées et sensibilisées in vivo	64
a) <i>marquage des cellules</i>	
b) <i>prélèvement des échantillons</i>	
c) <i>comptage des échantillons</i>	
d) <i>administration de l'agglutinine</i>	
3 - Influence du sérum de lapin sur l'hémagglutination	66
III - RESULTATS.....	66
1 - Marquage par le ⁵¹ Cr et sensibilisation in vitro	66
a) <i>durée de vie des hématies normales</i>	
b) <i>durée de vie des hématies après contact avec l'agglutinine de Phaseolus vulgaris</i>	
c) <i>durée de vie des hématies après contact avec l'agglutinine de Lactarius controversus</i>	

- d) durée de vie des hématies après contact avec l'agglutinine de Boletus subtomentosus*
- e) comparaison des durées de vie des hématies restantes (étude de la survie après 3 jours)*
- f) scintigraphie et comptage des viscères après action d'une dose forte de Boletus subtomentosus.*

2 - Marquage des hématies par le DF ³² P et sensibilisation in vivo	86
--	----

- a) durée de vie des hématies normales*
- b) durée de vie des hématies après injection de l'agglutinine de Lactarius controversus*

3 - Influence du sérum de lapin sur l'agglutination	89
---	----

IV - DISCUSSION	98
-----------------------	----

INFLUENCE DES OSES SUR LES AGGLUTININES	105
---	-----

Introduction	107
--------------------	-----

Matériel et méthodes	111
----------------------------	-----

Résultats	114
-----------------	-----

Discussion	120
------------------	-----

CONCLUSIONS GENERALES	133
-----------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	143
---------------------	-----

2ème SUJET : Propositions données par la Faculté :

« Substances à spécificité de groupe sanguin humain en dehors du règne animal ».

Vu, le Président de Jury

Clermont-Fd, le 28 Mai 1970

M. COULET

Vu et Permis d'Imprimer

N° Ph 4/70

Le Doyen

Clermont-Fd, le 28 Mai 1970

G. MEYNIEL

